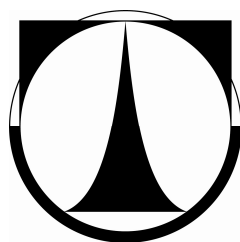


TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
FAKULTA TEXTILNÍ



# DIPLOMOVÁ PRÁCE

Liberec 2011

Petra Pulíčková

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
FAKULTA TEXTILNÍ  
KATEDRA NEKANÝCH TEXTILIÍ



Studijní program: M3106 Textilní inženýrství

Studijní obor: Netkané textilie

STUDIUM STRUKTUR TKÁŇOVÝCH NOSIČŮ  
POMOCÍ STEREOLOGICKÝCH METOD

STUDY OF TISSUE CARRIERS VIA  
STEREOLOGICAL METHODS

Vedoucí diplomové práce

Prof.RNDr. David Lukáš,CSc.

Autor

Petra Pulíčková



VLOZIT ORIGINAL/KOPII ZADANI DP

## **PROHLÁŠENÍ**

Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že na tuto diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo. Zároveň tím беру na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu.

Diplomovou práci jsem vypracoval(a) samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce.

Datum

.....

Podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala panu Prof. RNDr. Davidu Lukášovi, CSc za odborné vedení práce, za poskytnutí cenných rad a podnětů po celou dobu vzniku práce a Ing. Jitce Färberové za poskytnutí odborné literatury. Také bych ráda poděkovala panům Ing. Jiřímu Chvojkovi a Ing. Petrovi Mikešovi, Ph.D za odborné vedení experimentální části v oblasti zvlákňování a decelularizace. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Maroši Tunákovi, Ph.D za pomoc při hodnocení vlákných struktur spektrálními metodami a v neposlední řadě děkuji panům Doc. MUDr. Mgr. Zbyňku Tonarovi, Ph.D ze Západočeské univerzity v Plzni a prof. Mudr. Zoltánu Tomorimu, DrSc z Ústavu experimentální fyziky v Košicích za umožnění hodnocení vybraných stereologických metod v programu Ellipse a tím poskytnutí cenných informací ke konkrétním problémům.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se věnovala přípravě vláknenných systémů sloužících jako podkladový materiál pro růst nových buněk a studiu jejich struktur pomocí vybraných stereologických metod. Vláknenné systémy se připravily elektrostatickým zvlákňováním úpravou vstupních podmínek a následně zobrazily elektronovou mikroskopií. Výsledky měření se porovnaly se strukturou mezibuněčné hmoty tkání, které jsme získaly jejím odbuněčením (decelularizací). Decelularizace se provedla chemickou metodou a byly pro ni vybrány chrupavka hrtanu a arterie ovce.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Scaffold, decelularizace, stereologie, tkáň, tkáňové inženýrství, elektrostatické zvlákňování.

## **ANNOTATION**

The thesis was focused on fibre systems preparation that are being used as a base material for cells growth and study of their structure via chosen stereological methods. Fibre systems were prepared by electrospinning with modified entry conditions and were pictured by an electron microscopy afterwards. Measuring results were compared with the structure of intercellular tissue mass that was obtained by decellularization. Decellularization was done by chemical method, a throat cartilage and a sheep artery were chosen for it.

## **KEY WORDS**

Scaffold, decellularization, stereology, tissue, tissue engineering, electrostatic spinning.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

0 – D – bodový, bezrozměrný

1 - D – jednorozměrný

2 – D – dvojrozměrný

3 – D – trojrozměrný

A ( a ) – plocha (  $m^2$  )

$\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$  – síť úhlů

a, b – hlavní a vedlejší poloosa

CaCl<sub>2</sub> – Chlorid vápenatý

CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> - Aceton

CH<sub>3</sub>COOH – kyselina octová

CH<sub>3</sub>COOOH – kyselina peronová

DOC – deoxycholát sodný

ECM – extracelulární matrix, mezibuněčná hmota

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová -  $[CH_2N(CH_2CO_2H)_2]_2$

EGTA – ethylenglykol-bis-aminoethylether

F( u,v ) – koeficient 2D DFT v souřadnicovém systému

Fyziologický roztok - 0,9% vodný roztok chloridu sodného.

GAG – kyselina glutamová

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – kyselina sírová

HA – kyselina hyaluronová

HCHO – formaldehyd

HCl – kyselina chlorovodíková

Heparin- mukopolysacharid, antikoagulant

HFP – hexyfluoropropylen

CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamonio]-1-propansulfonát

Chondroitin sulfát – glukosaminoglykan

I<sub>i</sub> – počet průsečíků povrchu s lineární sondou pro obrázek s indexem i

LA - délková hustota profilů objektů v řezu (  $m^{-1}$  )

L ( l ) – celková délka ( m )

L<sub>v</sub> – délková hustota (  $m^{-2}$  )

NaN<sub>3</sub> - Azid sodný

NH<sub>3</sub> - hydroxid amonný  
N<sub>v</sub> – numerická hustota ( m<sup>-3</sup> )  
PCL – polykaprolakton  
PGA . kyselina polyglykolová  
PLA - kyselina mléčná  
PLGA - poly(D,L-mléčná-ko-glykolická kyselina)  
PLLA - poly(L-mléčná) kyselina  
PMSF – fenylmethylsulfonylfluorid  
PPF - poly( propylen –fumarát)  
PVA – polyvinylalkohol  
PVAc – polyvinylacetát  
S<sub>α</sub> - stupeň anizotropie  
SDS – Dodecyl sulfát sodný  
S<sub>v</sub> – povrchová hustota ( m<sup>-1</sup> )  
TBP – Fosforečnan tribulnatý  
TBS - Tris pufr – pufrovaný sodný roztok  
Triton X – 100 – polyoxyethylen(9,5)oktylfenol ( t-Okt-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>OH,)  
Triton X – 200- Octylphenoxypolyethoxyethyl sulfonát sodný  
V<sub>max</sub> – maximální hodnota měřené vlastnosti  
V<sub>min</sub> – minimální hodnota měřené vlastnosti  
V<sub>v</sub> – objemový podíl  
xi – počet průsečíků  
Σ - suma

## OBSAH

2	ÚVOD .....	10
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1	Trojrozměrná konstrukce nosiče pro tkáňové inženýrství .....	11
2.1.1	Biomateriály pro výrobu scaffoldů.....	13
2.1.2	Techniky přípravy scaffoldů .....	15
2.2	Decelularizace tkání a orgánů .....	19
2.2.1	Fyzikální metody .....	20
2.2.2	Chemické metody .....	21
2.2.3	Enzymatické metody .....	23
2.2.4	Testování účinnosti.....	23
2.3	Výroba scaffoldů pomocí elektrostatického zvlákňování .....	25
2.3.1	Povrchová morfologie .....	27
2.3.2	Zbytková rozpouštědla .....	29
2.3.3	Začleňování bioaktivních látek do struktury .....	30
2.3.4	Nanokompozitní vlákna .....	30
2.4	Tkáně .....	32
2.4.1	Kloubní chrupavka .....	34
2.4.2	Hrtan .....	37
2.4.3	Arterie.....	38
2.5	Stereologie.....	39
2.5.1	Přehled sond a kvantifikovaných veličin.....	39
2.5.2	Poměry a odhady .....	41
2.5.3	Odhad délek lineárních struktur ve 2-D .....	41
2.5.4	Anizotropie.....	42
2.5.5	Obrazová analýza a stereologie .....	50
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	51
3.1	Příprava vzorků .....	51
3.1.1	Výroba nanovláknenných vrstev elektrostatickým zvlákňováním.....	51
3.1.2	Zvlákňování z tyčky .....	51
3.1.3	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii .....	52
3.2	Měřicí zařízení.....	54
3.2.1	Elektronová mikroskopie .....	54
3.2.2	Obrazová analýza .....	54
3.3	Experimenty .....	55
3.3.1	Měření vybraných parametrů obrazovou analýzou .....	56
3.3.2	Směrová orientace vláknenných struktur .....	60
3.3.3	Příprava vzorků na decelularizaci .....	64
3.4	Výsledky.....	68
3.4.1	Vyhodnocení měření průměru vláken .....	68
3.4.2	Vyhodnocení anizotropie .....	69
3.4.3	Vyhodnocení měření délek lineárních struktur .....	70
3.4.4	Vyhodnocení decelularizovaných tkání .....	72
4	ZÁVĚR.....	74
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	76
6	SEZNAM PŘÍLOH .....	78

# 1.ÚVOD

Tématem mé diplomové práce je studium struktur tkáňových nosičů (scaffoldů) pomocí stereologických metod. Jinými slovy jedná se o napodobení struktury tkáně umělým nosičem, pomocí kterého by do organismu implementoval zdravé buňky schopné samostatné reprodukce. V určitých případech poškození nebo onemocnění tělo již nedokáže tyto buňky produkovat a tudíž není schopno nahradit buňky poškozené nebo chybějící. Do jisté míry je řešením operace, která by poškozené tkáně nebo buněčné struktury nahradila transplantací od dárce. I v tomto případě se jedná o rizikový proces, protože i přes maximální shodu dárce s příjemcem, dochází k obranným reakcím organismu na cizorodé látky, ať už mluvíme o syntetické nebo biologické bázi.

Snažíme se vyrobit takovou strukturu, blížící se struktuře lidské, která by nejlépe zaručila biologickou aktivitu a životaschopnost buněk pěstovaných na tomto podkladu. Výroba nosiče pomocí elektrostatického zvlákňování se zdá jako nejúčinnější metoda i s ohledem na eliminaci znečištění, které by připadalo v úvahu u metod mechanické výroby jako je pletení a tkaní. Navíc se jedná o produkci velmi jemných vláken, které se svojí strukturou blíží extracelulární matici reálných tkání. S ohledem na tkáňové nosiče se práce zaměřuje na struktury decelularizovaných tkání, které zároveň poslouží jako předloha, podle které bude snaha napodobit vznikající nosič pomocí elektrostatického zvlákňování.

Teoretická část práce se věnuje zasvěcení čtenáře do dané problematiky, vysvětlení nutných pojmů pro jeho pochopení a přípravě na praktickou část práce, která na ní úzce navazuje. Tato část se pak bude zabývat výrobou vlákenných struktur, a hlavně studiem jejich morfologických vlastností pomocí vybraných stereologických metod tak, aby se dalo diskutovat o jeho vhodnosti a využití.

Protože je práce základním osvětlením daného problému a tématu, svým charakterem nabízí pro budoucí studenty postačující vysvětlení teoretické části, zjednoduší jejich práci v tom, aby se mohli více zaměřit na experimentální část výzkumu, která vždycky diskutované a sporné části nakonec rozhodne.

Cílem této práce je získání plnohodnotných výsledků v oblasti měření vlákenných struktur získaných elektrostatickým zvlákňováním, dále získání decelularizovaných tkání tak, aby se mohla vyhodnotit úspěšnost provedené decelularizace a také získání snímků, které bychom pomocí stereologie proměřili a porovnali s vytvořenými vlákennými strukturami.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část práce se rozděluje do čtyř kapitol a slouží jako informační blok pro pochopení daného tématu. Protože je práce zaměřena na tkáňové nosiče, budeme se tkáňovým inženýrstvím zabývat v první kapitole. Decelularizace neboli odbuněčnění tkání je tématem druhé kapitoly. Jak už bylo řečeno úvodem, elektrostatické zvlákňování je pro výrobu scaffoldů ideální výrobní metoda a je jí věnována třetí kapitola. Čtvrtá kapitola je věnována tkáním, na kterých už byly úspěšně provedeny klinické testy – chrupavky, a dále které byly použity pro decelularizaci v experimentální části. Poslední část je věnována stereologii, zaměřuje se na vysvětlení základním pojmů a podrobně se zabývá stereologickými metodami, které byly použity v experimentální části.

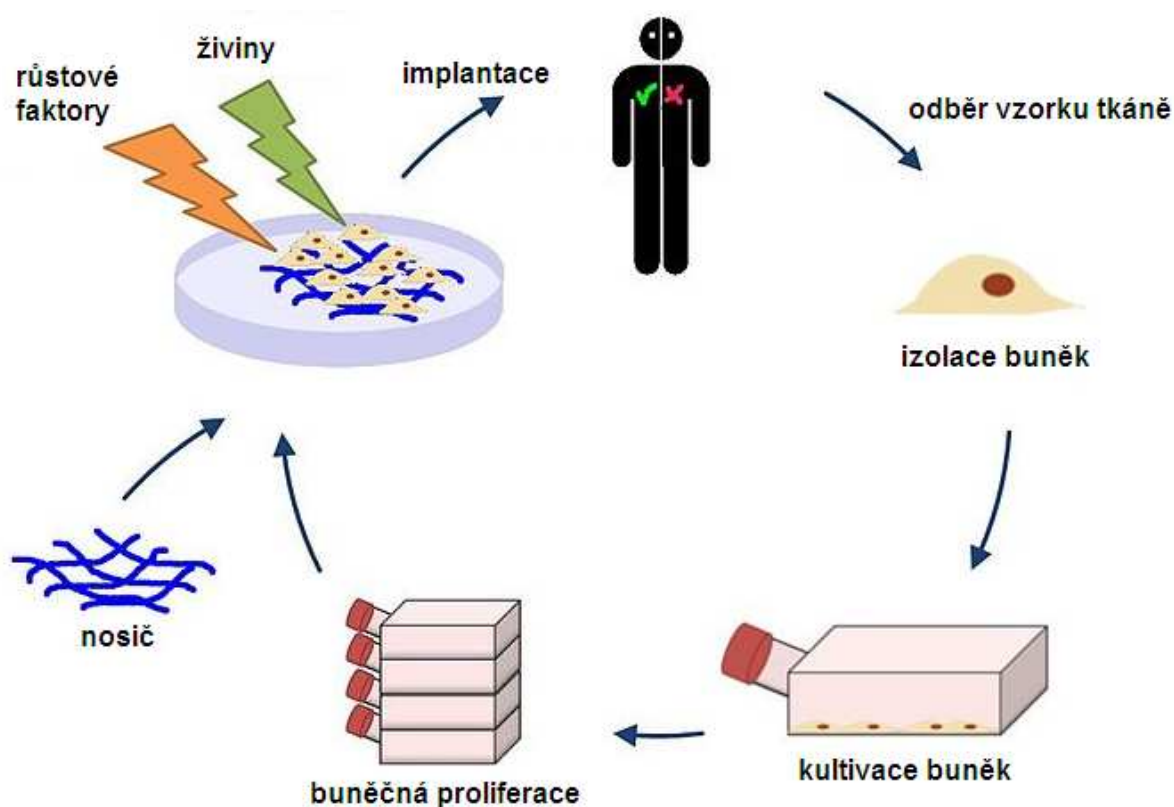
### 2.1. Trojrozměrná konstrukce nosiče pro tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární vědní obor, který kombinuje znalosti a technologie buněčné biologie, biochemie a konstrukčních materiálů vhodných pro tkáňové nosiče tak, aby se docílilo nejen regenerace a obnovy poškozených tkání a orgánu, ale i vytvoření nových substrátů. Jedná se koncepci, podle které se nejprve odebere pacientovi tkáň a z ní následně izolují buňky. Ty se rozmnoží a nasadí na vhodný nový nosič ( scaffold - lešení ). Kultivace probíhá in vitro (v laboratorních podmínkách) v přítomnosti růstových faktorů a živin a následně se uměle vytvořená tkáň implantuje do těla (in vivo). Regenerace těchto tkání probíhá v přirozeném prostředí těla, dochází k infiltraci buněk a mezibuněčné hmoty do struktury scaffoldu a nakonec k degradaci nosiče vedoucí k nově vzniklé tkáni na poškozeném místě. Lešení vlastně poskytuje počáteční podporu buňkám pro jejich následnou proliferaci (hojné množení, bujení) a diferenciaci, poskytuje prostředí pro růstové faktory stejně, jako tak činí extracelulární matrix v těle (obrázek č. 1). Diferenciace je biologický proces, při němž se buňky rozrůžňují do jednotlivých typů. Je to právě ECM, který v těle určuje strukturální integritu tkáně. Je proto nezbytné, aby lešení co možná nejvíce napodobovalo strukturu a vlastnosti lidské tkáně.

Ideální lešení by mělo mít tyto vlastnosti:

- struktura by měla napodobit rozsáhlou síť navzájem propojených pórů tak, aby buňky mohly volně migrovat, množit se a osídlit i místa hluboko uvnitř konstrukce.

- scaffold musí být dostatečně propustný pro živiny a kyslík ve všech místech, musí umožňovat i odplavení odpadních produktů buněk.[1]
- nosič musí být biokompatibilní.
- podklad pro novou tkáň musí mít vhodný tvar a mechanické vlastnosti (pevnost, plošnou hmotnost, objem atd.)
- biodegradace lešení



Obr.č.1: Koncepce tkáňového inženýrství [2]

Biodegradace je rozpad pevných materiálů způsobený rozkladem makromolekul a jejich rozptýlení in vivo bez důkazů o jejich vyloučení z těla. Vede ke ztrátě celistvosti materiálu a zhoršení jeho biomechanických vlastností. Rychlost degradace je tudíž důležitým faktorem při volbě konkrétní aplikace. Zatímco vhodná rychlost degradace pro kostní implantáty je jeden a až dva roky, degradace nosiče pro chrupavky by neměla překročit tři měsíce. [3]

Biokompatibilita neboli snášenlivost materiálu v biologickém prostředí. Biokompatibilní materiál se posuzuje podle interakce s prostředím zejm. podle cytotoxického

hlediska, podle toxikologických a alergických reakcí, podle karcinogenních a mutagenních reakcí, podle vlivu na infekční procesy. Je důležité, aby materiál neovlivňoval koagulace, nevyvolával zánětlivé reakce a nevolňoval potenciálně toxické látky. [4]

Biomateriály používané v tkáňovém inženýrství pro výrobu scaffoldů můžeme rozdělit podle původu na přírodní a syntetické. Většina materiálu je převzata z jiných oborů medicíny, kde se už běžně používají (švy). Syntetické biologicky odbouratelné materiály jako jsou alifatické polyestery (kyselina polymléčná, polyglykolová a jejich kopolymery) a přirozeně získané materiály jako kolagen a chitin. [1]

V následujícím textu se budeme blíže seznamovat s biomateriály používané pro výrobu tkáňových nosičů, budou porovnávány výrobní postupy, jejich výhody při výrobě struktury lešení, včetně velikosti pórů a jejich účinky na buňky a jejich růst. V současné době se stále hledají nové materiály a cesty k vytvoření ideálního scaffoldu.

### **2.1.1. Biomateriály pro výrobu scaffoldů**

Základní požadavky biomateriálů je jejich biokompatibilita a vhodné povrchové vlastnosti vyhovující celulárnímu připojení, proliferaci a diferenciaci. Polymery, jejímž hlavní řetězec je vystaven z vazeb C - C jsou nebiodegradabilní, na rozdíl od řetězců s heteroatomem, který biodegradabilitu zajišťuje. Dá se ovšem vhodnou chemickou reakcí do řetězců zanést další skupiny např. amidové vazby, estery a anhydridy, které rovněž zajišťují biodegradabilitu.

Biomateriály mohou být buď přírodní nebo syntetické. Syntetické materiály jsou využívány více pro možnost přizpůsobit jejich výrobní proces, tak aby vlastnosti vzniklého vlákna odpovídaly vlastnostem ECM, které lze předpokládat. Nejčastěji biologicky rozložitelné polymery jsou kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a jejich kopolymery, (DL-kyselina mléčná - co - glykolová PLGA), polykaprolakton (PCL). [1]

Kyselina polymléčná je termoplastický, alifatický polyester. Na konci 80-tých let byla nalezena technika bakteriální fermentace D - glukózy získávané z kukuřičného škrobu, která umožnila výrobu těchto biodegradabilních polymerů v širším měřítku. Vzhledem k chirální struktuře kyseliny mléčné existuje ve dvou stereoizomerech L a D, které zcela ovlivňují vlastnosti dané kyseliny jako je krystalinika a bod tání. Stereoizomery mají všechny atomy v molekule vázané stejným způsobem, ale jejich prostorová geometrie je rozdílná. [5] Z 99,5

% je fermentací získána pouze L - forma.( Zdroj : Centrum pro podporu konkurenceschopnosti v biomedicínských technologiích. [3]

Kyselina polyglykolová je nejjednodušší lineární alifatický polyester. Díky vysokému stupni krystalinity se obtížně rozpouští v organických rozpouštědlech. Produktem degradace je netoxická kyselina glykolová, která je z organismu plně vyloučena do půl roku. [3]

Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové vzniká kopolymerací dvou monomerů PLA a PGA. Existují různě kopolymery s různým zastoupením jednotlivých složek. Tento poměr výrazně ovlivňuje vlastnosti včetně těch degradačních. Elektrostaticky zvlákněná PLGA nanovláknina nanosená na pleteninu vytváří scaffold dobré mechanické vlastnosti a vnitřní hierarchické struktury. [6]

Poly(e-kaprolakton) PCL je semikrystalický polymer patřící do skupiny alifatických polyesterů. Má podobnou biokompatibilitu jako PLA a PGA, ale mnohem nižší rychlost rozkladu. To ho činí méně atraktivním pro tkáňové nosiče, ale velmi dobrým kandidátem pro dlouhodobé nosiče léků. [1] Dále slouží pro výrobu chirurgických nití a vláken. Připravuje se katalytickou kondenzací z E-kaprolaktonu. .

Poly(propylen - fumarát ) PPF je lineární polyester, který obsahuje nenasycené dvojné vazby, které jsou k dispozici při zesíťování polymeru. K degradaci polymeru v těle dochází hydrolýzou esterů. Jeho výhodou je možnost aplikace polymeru pomocí injekce přímo na defekt. Přestože zesíťovaný polymer je biokompatibilní a má schopnost fyzikální podpory pro depozici nové kostní tkáně ( osteokondukcce ), PPF sám o sobě není stimulant osteogeneze (tvorba a vyžrávání kostí).[1]

Jak vlastně polymery v těle degradují? Předně umístěním polymeru ve vodném roztoku začíná pokles jeho molekulové hmotnosti. Ke ztrátě molekulové hmotnosti polymeru a tudíž jeho degradace nedojde dokud se molekulární vazby neztění do té míry, aby umožnily volný pohyb jednotlivých částic a uvolnění z polymerní matrice. Hmotnostní ztráta je doprovázena uvolňováním kyselých bi-produktů. Pokud je kapacita okolní tkáně na odstranění těchto produktů nízká, může docházet ke zpomalení procesu degradace a ke vzniku zánětlivých reakcí.

Kolagen je vláknitý polymer a jedna ze základních složek ECM. Je to nejhojněji se vyskytující protein u savců a je hlavní stavební prvek kůže, kostí, šlach, chrupavek, cév a srdečních chlopní. Je známo 25 typů kolagenu odlišující se od sebe chemickým složením a molekulární strukturou. Kolagen typu I vytváří vhodné prostředí pro diferenciaci osteoblastů in vitro. Tento typ se využívá ve tkáňovém inženýrství samostatně i v kombinaci pro scaffoldy měkkých tkání jako je kůže. Kolagen má více nativní povrch než syntetické

polymery umožňující lepší celulární připojení. V tkáňovém inženýrství se používá i denaturovaný kolagen (želatina) [1]

Chitosan je další důležitý přírodní biopolymer obsahující glukosamin a N-acetylglukosamin. Získává se deacetylací chitinu a používá se k hojení ran. Chitin je po celulóze druhý nejrozšířenější přírodní materiál. Přírodní polysacharid vyskytující se ve škeblích, skořápkách krabů, raků a garnátů. Chitosan je podobně jako chitin nerozpustný ve vodě a běžných rozpouštědlech. Biodegradační rychlost tohoto polymeru je závislá na množství azylových skupin, které jsou po deacetylaci přítomny. Chitosan je dále zpracováván do membrán a matric aplikovaných v tkáňovém inženýrství. Nevýhodou je malá pevnost za mokra, která se obvykle řeší směsí vláken. [6]

Škrob je přírodní polysacharid, který byl také zkoumán pro tkáňové inženýrství. Rozmanité vlastnosti činí tento materiál potenciálně vhodným pro široké uplatnění v medicíně od scaffoldů po systém podávání léků. V praxi se škrob často používá v kombinaci s acetátem celulozy a PLA. [3]

Pavoučí hedvábí je unikátní materiál jak z hlediska struktury tak i vlastností. Pavouk spřádá hedvábí z vodného roztoku, který na vzduchu tuhne a vzniká vlákno neobyčejných vlastností. Na rozdíl od hedvábí bource morušového produkují pavouci různé typy hedvábí, nerozpustné ve vodě, biodegradabilní s vynikajícími vlastnostmi. Hedvábné proteiny mají jasnou výhodu oproti jiným přírodním materiálům a to v kombinaci pevnosti a houževnatosti.[2]

Většina času a úsilí na vytvoření vhodného scaffoldu je směřována k syntetickým materiálům s ohledem na možnou kontrolu jejich vlastností. Na druhou stranu jsou tyto materiály více náchylné k zánětlivým reakcím ze strany substrátu. Přírodní materiály hovoří v tomto ohledu významně pro jejich užití, hlavně polysacharidů a bílkovin, které usnadňují buňkám jejich funkci. Řešením je tedy hybrid těchto materiálů, který kombinuje výhody obou přírodních i syntetických biomateriálů. [1]

### **2.1.2. Techniky přípravy scaffoldu**

Jak bylo uvedeno výše existují různé biomateriály, které jsou k dispozici pro regenerativní medicínu a tudíž i mnoho technik pro jejich zpracování. Pro zjednodušení uvedu pouze velmi často citované metody a rozdělím je na netextilní a textilní způsob výroby.

## ***Vymývání částic***

Jedná se o velmi oblíbenou netextilní výrobu na jejímž začátku je příprava formy, do které se vhodně umístí částice přesně definovaných tvarů a velikostí. Obvykle se používají částice solí, vosků nebo cukrů. Do formy se nalije roztok polymeru a rozpouštědla, které se po čase odpaří. Tím se vytvoří tuhý materiál složený z polymeru a částic. Posledním krokem je vymytí částic vhodným rozpouštědlem. Podle rozmístění částic, jejich velikosti a tvaru můžeme vytvářet požadovanou strukturu velmi efektivně a snadno. Bohužel funguje pouze pro velmi tenké membrány a 3 - D scaffoldy. U silnějších vzorků je velmi obtížné odstranit všechny rozpustné částice z polymerní matrice. Částečně tento problém obejdeme, pokud jednotlivé tenké membrány na sebe nalaminujeme, ale vrstvení tenkých porézních listů je časově náročné a umožňuje jen omezený počet vrstev. [3]

## ***Solvent casting***

Metoda spočívá ve vypařování rozpouštědla z roztoku polymerních materiálů. V postupném vypařování a zároveň vytvrzování polymeru dochází k vytváření porézních membrán. Jedná se o techniku dostupnou a relativně levnou. Nevýhodou jsou opět vysoce toxická rozpouštědla, která, pokud nejsou důkladně odstraněna, negativně ovlivňují funkci scaffoldu. Odstraňování zbytků rozpouštědel pomocí kvalitního sušení ve vakuu je efektivní, ale velice časově náročné. Proto se často kombinují jiné technologie, aby se celý postup urychlil s maximálním výsledkem. [3]

## ***Sušení za mrazu - lyofilizace***

Základem této metody je proces sublimace a podstatou dvě nemísitelné kapaliny - rozpouštědlo a nerozpouštědlo. Jedna z kapalin polymer rozpustí a druhá nikoliv. Polymer se nejprve rozpustí v rozpouštědle a následně vmícháním nerozpustné složky vytvoříme emulzi. Tu nalijeme do formy a prudce zchladíme např. pomocí kapalného dusíku. Následným procesem sušení za mrazu dojde k odstranění obou složek. Scaffoldy vyrobené touto metodou mají výhodu vysoké pórozity. Nevýhodou je vysoká citlivost na okolní prostředí, které ho ovlivňuje a z toho plynoucí obtížná výroba duplicitních nosičů. [3]

## ***Zpěňování***

Zpěňování polymerních roztoků mechanickým způsobem do formy tuhé pěny a její následné vysušení vede k vytvoření scaffoldů s propojenými póry dostatečných velikostí, přičemž velikost póru je závislá na koncentraci polymeru ve zpěňovaném roztoku. S rostoucí koncentrací roste počet póru v objemu a póry se zmenšují. Nevýhodou této metody je omezené množství polymerních roztoků schopných vytvořit stabilní pěnu bez přídavku povrchově aktivních látek. Příkladem takového polymeru je např. želatina. [3]

## ***Rapid prototyping***

Rapid prototyping neboli rychlá výroba prototypů je technika vztahující se ke skupině technologií, které používají počítačem podporovaný design (CAD systémy, výpočetní tomografi) k vytvoření trojrozměrných objektů. Technologie umožňuje vytvoření tvarově komplikovaného objektu na zakázku z počítačových dat. Na faktické vytvoření scaffoldů z těchto předloh se používá různých technik např. vytvrzování kapalného polymeru po jednotlivých vrstvách pomocí laserového paprsku (stereolitografie) nebo je laserový paprsek použit k vyřezávání tvaru jednotlivých vrstev z polymerní folie a ty následně slepeny (modelování laminovaných objektů). V současné době se běžně používá více než 20 technik. Výhodou těchto metod obecně je vytváření složitých a komplikovaných struktur podle přesných představ bez časové náročností, bez kontaminace ze strany výroby a komplexnost výroby zajišťuje finanční úsporu. [3]

## ***Hydrogely***

Velice důležitou skupinou biomateriálů jsou hydrogely v podobě zesíťovaného hydrofilního polymeru. Při kontaktu s vodou bobtnají. Absorbují velké množství vody, aniž by se sami rozpustily. Tím získávají velmi specifické vlastnosti podobné měkkým tkáním. Polymery, které přirozeně tvoří hydrogely, jsou například algináty, kyselina hyaluronová a fibrin. [3]

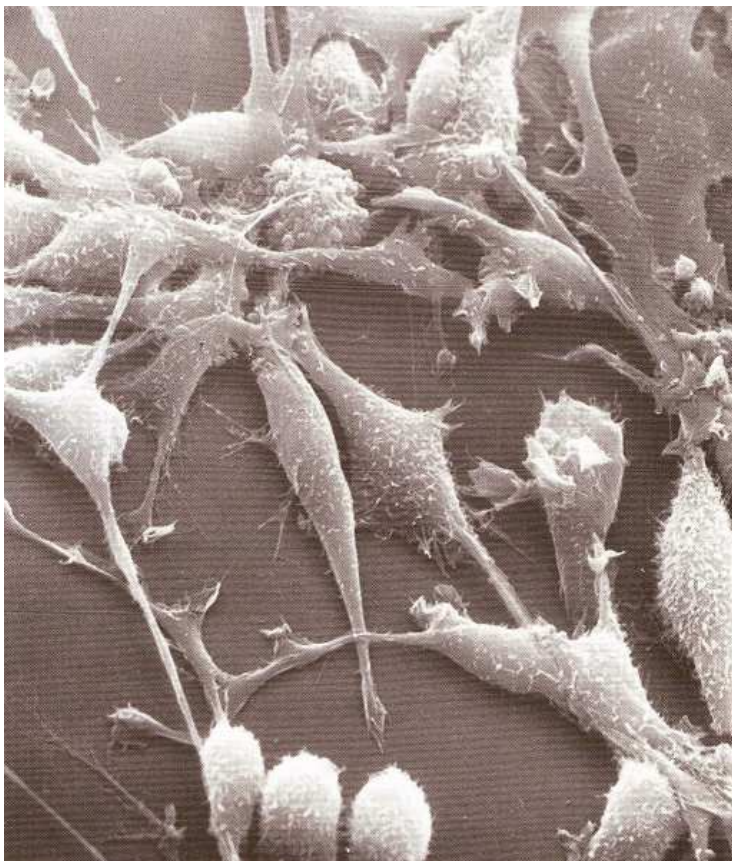
## ***Další technologie vhodné k výrobě scaffoldů***

Výhodou textilních metod je jejich variabilita ve výrobě porézních vlákenných materiálů. Flexibilita a otevřená porézní struktura textilních nosičů napodobují svojí strukturou přirozenou extracelulární matrix. Navíc dostatečně vysoká pórozita umožňuje snadné pronikání buněk rovnoměrně v celém objemu nosiče. Hojně se používají právě pro tkáňové nosiče kloubních implantátů, kde se uplatňuje především technika trojrozměrných tkanin a pletenin. Tkaniny mají výborné mechanické vlastnosti, pleteniny mají vysokou roztažnost, jsou extrémně poddajné, prodyšné a stačitelné, což vyplývá z otevřené geometrie oček. Pomocí vazby je možné měnit pórozitu stejně jako míru trojrozměrnosti. Netkané textilie coby tkáňové nosiče se používají také velmi často. Výhodou těchto scaffoldů jsou bezpochyby náhodná orientace vláken, vysoká porozita s vhodnou velikostí pórů, dostatečné mechanické vlastnosti. Další výhodou těchto procesů je výroba přímo z vlákenného materiálu a tudíž snížení nákladů výroby a vysokou produktivitu.

Formování vláken přímo z polymerního roztoku jen s pomocí elektrostatického pole je jednou z nejmodernějších textilních technologií. Výrobě scaffoldů elektrostatickým zvlákňováním bude věnována celá jedna kapitola. [3]

Bohužel i přes dosavadní znalosti materiálů a výrobních technik, znalosti buněčné biologie a biochemie, kromě kultivace chrupavek a kůže, které už pokročily do klinické fáze, jsou testy ostatních lidských tkání jako játra a ledviny stále neúspěšné. Jedním z důvodů je jejich složitá struktura s různými funkcemi a bohatá síť kapilár. Úspěch závisí na schopnosti implantovaných buněk připojit se k okolnímu prostředí a stimulovat angiogenezi (formování nových krevních cév). Kombinace vysoké hustoty buněk a vhodného substrátu je nezbytná k vytvoření spolupráce mezi buňkami navzájem a maticí. [1]





Obr.č.2: Snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu. Proliferace buněk in vitro při vhodné směsi živin a růstových faktorů. [7]

## 2.2. Decelularizace tkání a orgánů

Decelularizace neboli odbuněčnění spočívá v odstranění veškerého buněčného materiálu a ponechání jen extracelulární matrix ECM (mezibuněčná hmota). ECM je jakési lešení, nosič, na kterém buňky rostou a podle instrukcí ECM také diferencují (vývojově rozrůžňují)

Cílem decelularizace ovšem není jen účinně odstranit veškerý buněčný materiál, je nutné minimalizovat nežádoucí účinky zvolené metody na složení, biologickou aktivitu a mechanickou neporušenost zbývající ECM tak, aby bylo možné tento nosič osídlit novou hostitelskou tkání. Jednotlivé komponenty ECM jsou obvykle mezi druhy zachovány a velmi dobře tolerovány imunitním systémem. Náplní této práce není získanou ECM osídlit novou tkání, ale pomocí stereologie tuto ECM prozkoumat, posoudit její vlastnosti a na základě těchto poznatků pokusit napodobit nově vytvořený nosič. [8]

Účinnost odstranění buněk z tkání závisí nejen na původu tkání, ale také na zvolené metodě, kterou decelularizaci provádíme. V následující kapitole se pokusím nejčastěji používané metody popsat včetně možných dopadů těchto metod na biochemické složení, strukturu a mechanické chování výsledné ECM.

Záměrem většiny metod je minimalizovat narušení, a tak zachovat přirozené mechanické a biologické vlastnosti získané ECM. Nejčastěji používaná metoda je kombinace fyzikálního, chemického a enzymatického postupu. Nejprve je nutné narušit vnější buněčné membrány fyzikálním nebo iontovým postupem, následuje separace buněčných složek z ECM pomocí enzymů a rozpouštění cytoplazmy a jader pomocí chemických složek. Odstranění buněčných zbytků se může provádět i mechanicky. Samozřejmě je nutné zbytkové chemikálie z ECM odstranit, abychom se vyhnuli nepříznivé reakce ze strany hostitelských buněk. [8]

### **2.2.1. Fyzikální metody**

Fyzikální metody, které se mohou k decelularizaci použít, jsou zejména zmrazení, působení tlaku, použití ultrazvuku a mechanické třepání.

#### ***Vymražování***

Zmrazení tkání se nejčastěji používá pro tkáně šlachovité, vazivové a nervové. Vlivem rychlého zmrazení dojde k vytvoření vnitrobuněčných krystalků ledu, které naruší vnější buněčnou membránu buněk a způsobí rozklad. Je nutné dodržovat rychlost teplotních změn, aby nedošlo k poškození ECM. Při rychlém zmrazení může dojít ke zlomu. Tato metoda je velmi účinná pro rozklad buněčných membrán, je ovšem nutné ji kombinovat s dalšími metodami, které nám zajistí odstranění buněčného materiálu z ECM.

#### ***Použití ultrazvuku a třepání***

Metoda mechanického třepání s použitím ultrazvuku spolu s chemickým ošetřením je další používaná kombinace při destrukce buněk a jejich odstranění z ECM. Mechanické třepání se provádí na orbitální třepačce, která je stejně účinná a efektivní při odstraňování

buněčného materiálu jako ultrazvuk. Další přístroje mechanického působení jsou nízkoprofilové válce a shakery. [8]

### **2.2.2. Chemické metody**

Působení kyselin a zásad – kyselina octová, kyselina peroctová (PAA), kyselina chlorovodíková, kyselina sírová a hydroxid amonný.

Alkalické a kyselé ošetření tkání je velmi účinné, rozpouští cytoplazmu buněk a narušují nukleové kyseliny (DNA a RNA), buněčné membrány a intracelulární orgány. Bohužel tyto chemikálie štěpí důležité molekuly GAG (kys.glutamová) z kolagenní tkáně ECM. Nejvíce studovanou a také používanou je kyselina peroctová (PAA) pro její šetrné účinky na ECM. Po její aplikaci je zachována většina molekul kyseliny glutamové a kys. hyaluronové, heparinu a chondroitinu sulfátu. Také byla prokázána přítomnost fibronektinu a zachovány mnohé růstové faktory včetně základního růstového faktoru fibroblastů. Použití PAA nemá vliv ani na mechanické chování ECM. Jedním z problémů decelularizace chemickou cestou je přítomnost bakterií, které mohou kontaminovat získaný ECM materiál. Proto se používají roztoky antibiotik jako penicilinu, streptomycinu a amfotericinu, které případné nežádoucí reakce potlačí.[8]

### ***Neionogenní detergenty***

Mezi neionogenní detergenty neboli smáčedla patří především triton X - 100. Smáčedla se používají pro jejich relativně mírné účinky na tkáňové struktury. Narušují interakce lipid - lipid a lipid - protein. Přitom ovšem neničí vazby mezi proteiny, takže tkáň nezmění prostorové funkční uspořádání. Výsledky testování tritonu X - 100 jsou velice rozdílné. Účinnost je závislá na použité tkáni a doplňující metodě decelularizace. Většinou vedou k úplné ztrátě GAG. [8]

## ***Iontové detergenty***

Mezi iontové detergenty patří dodecylsírán sodný SDS, triton X-200. Iontové detergenty účinně rozpouštějí cytoplazmu a buněčné membrány, ale také narušují interakce protein - protein, mají tendenci narušovat přirozené struktury tkáně, odstraňují GAG a poškozují kolagen. Pro vyšší účinnost se kombinují s některými obojetnými iontovými detergenty. [8]

## ***Obojetné iontové detergenty***

Obojetné iontové detergenty neboli amfiony jsou CHAPS. Obojetné iontové detergenty vykazují vlastnosti neionogenních i iontových detergentů. CHAPS byl studován při decelularizaci cév. Po aplikaci bylo zjištěno přibližně stejné množství kolagenu a elasticitu jako u zdravé tepny. Další obojetné iontové detergenty byly testovány pro decelularizaci nervů. Obojetné iontové detergenty se většinou používají v kombinaci s tritonem x- 100, tritonem x - 200 a deoxycholátem sodným.

## ***Fosforečnan tribulnatý***

Fosforečnan tribulnatý TBP je organické rozpouštědlo, které ničí viry v krvi. Nedávno byl použit k decelularizaci šlachových a vazivových štěpů. Došlo k úplnému odstranění jaderných zbytků a snížení obsahu kolagenu. Aplikace neměla vliv na mechanické vlastnosti získané ECM a určitě bude předmětem dalšího zkoumání. [8]

## ***Působení hypotonického a hypertonického roztoku***

Působením roztoků dochází k štěpení buněk uvnitř tkání a orgánů. Je nezbytné použití dalších enzymatických nebo chemických metod pro odstranění všech buněčných zbytků. Zvlášť obtížné je odstranění zbytků DNA vzhledem ke své lepkavé povaze mají sklon ulpívat na proteinech ECM. [8]

## ***Chelatační činidla***

Mezi chelatační činidla patří EDTA a EGTA. Chelatační činidla slouží k vyvazování některých iontů kovů z těla. Bylo prokázáno, že dvoumocné kationy vápníku a hořčíku jsou nezbytné pro navázání buněk na kolagen a fibronectin v ECM. Interakcí s těmito kovy dochází k uvolňování těchto buněk z ECM. Činidla se obvykle používají v kombinaci s trypsinem. [8]

### **2.2.3 Enzymatické metody**

Enzymatické metody zahrnují použití proteolytického štěpení, vápenatých chelatačních činidel a nukleáz (enzym, který hydrolyzuje vnitřní vazby nukleových kyselin a tím je rozkládá). Trypsin je jedním z nejčastěji používaným proteolytickým enzymem, který štěpí peptidické vazby uhlíku na straně argininu a lyzinu. Ideální podmínky jsou 37 °C při pH8. Enzymatické metody se neobejdou bez nepříznivých vlivů na extracelulární složky tkání a orgánů. Prodloužení expozice může narušit strukturu ECM, odstraňuje fibronectin, elastin a molekuly GAG. [8]

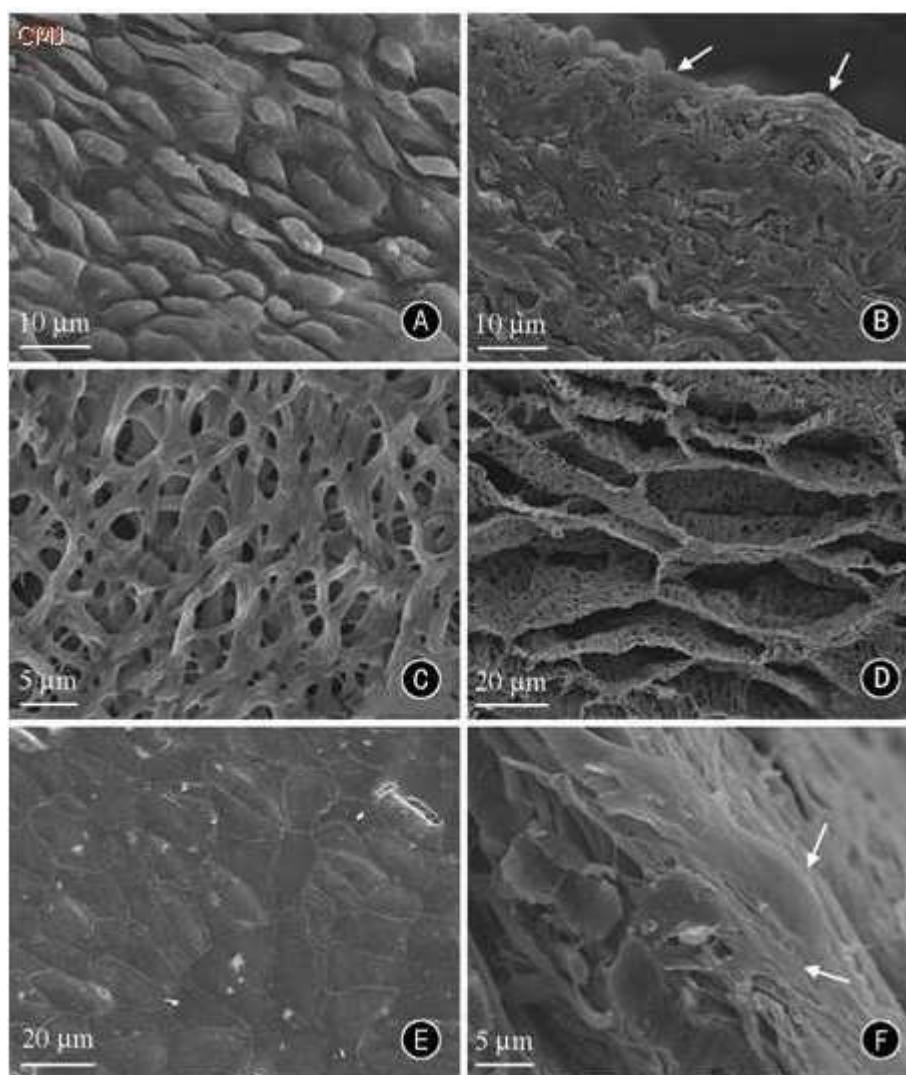
## ***Proteázni inhibitory***

Fenylmetylsulfonylfluorid PMSF je jedním z proteázni inhibitorů. Je nutné je používat, aby se zamezilo destrukci přirozené struktury ECM díky dlouhému působení chemikálií. Takovéto roztoky s pH 7 - 8 zpomalují proteolytické štěpení, v průběhu procesu vystavení buněk rozkladu kontrolují teplotu a čas. [8]

### **2.2.4 Testování účinnosti**

K dispozici máme celou řadu metod pro stanovení účinnosti decelularizace. Od standardního histologického barvení Hematoxylinem pro stanovení jaderné struktury, přes barvení vzorku fluorescenčními molekulami na přítomnost DNA, až po DNA sondy.

Abychom mohly posoudit účinnost té které metody je nezbytné posoudit žádoucí složky v ECM, které je nutné zachovat jako adhezní bílkoviny, fibronectin, molekuly GAG, růstové faktory, elastická vlákna a kolagen. Všechny tyto látky jsou nezbytné pro správnou infiltraci buněk hostitele v nosiči a to jak in vitro, tak i in vivo. Mechanické zkoušky nám poskytnou přehled o přítomnosti a neporušenosti strukturních proteinů. Přestože výše uvedené metody poskytují důležité informace týkající se účinnosti zvolených metod decelularizace, není dosud jasné, jaký vliv mají zbytkové částice buněčného materiálu a cytoplazmatických trosek v ECM na negativní odezvy hostitele. [8]



Obr.č.3: Snímky aorty plodu prasete před decelularizací a po ní.

Na obrázku č.3 jsou snímky pořízené scanovací elektronovou mikroskopií. Na snímku (A) je tkáňový vzorek aorty plodu prasete a (B) jeho průřez. Je možné vidět jednotlivé buňky

usazené v ECM. Snímek (C) je stejná tkáň po decelularizaci metodou enzymů tripsyn a nukleáz a (D) průřez. Je zde dobře vidět zachování třídimenzionální struktura ECM. Snímky (E,F) jsou přímý a boční pohled na tkáňový nosič osídlený novou tkání (kultivace in vitro). Šipky ukazují na vzniklé proteinové vazby mezi buňkami a mezibuněčnou hmotou. [9]

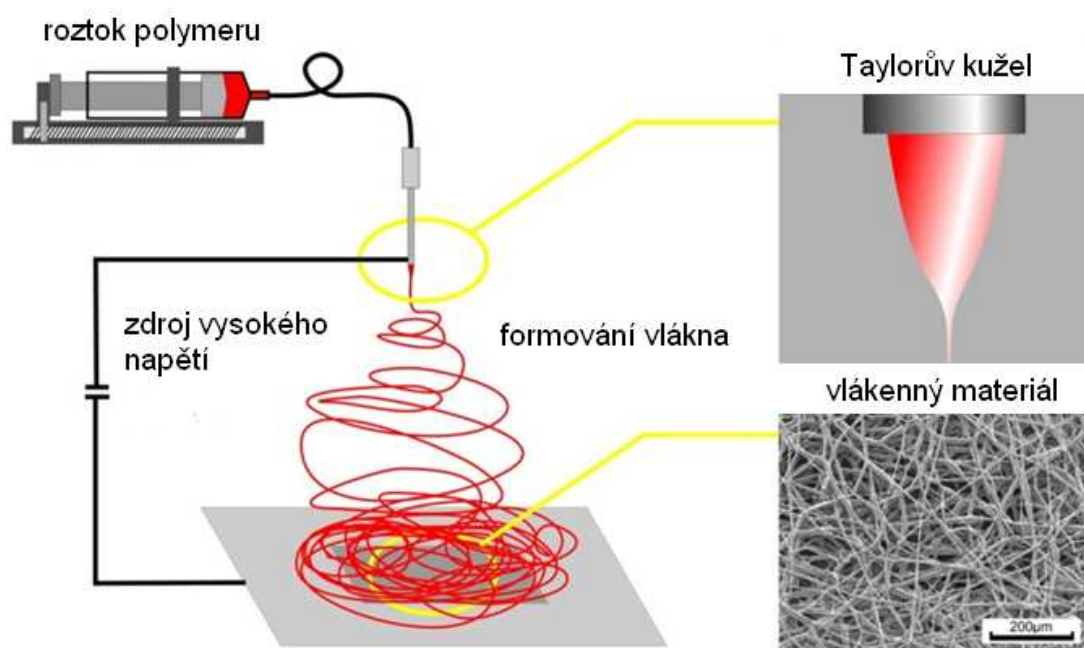
### **2.3. Výroba scaffoldů pomocí elektrostatického zvlákňování**

Tkáňové inženýrství, jak už bylo řečeno, zahrnuje výrobu třídimenzionálního lešení pro podporu buněčného růstu a množení. Jiná definice hovoří o rychle se rozvíjející oblasti, která se snaží opravit nebo nahradit tkáň nebo orgány pomocí kombinace buněk, biomateriálů nebo biologicky aktivních buněk. Ideální nosič musí splňovat řadu protichůdných požadavků:

- příslušnou pórovitost (velikost a polohu póru) umožňující migraci,
- dostatečnou půdorysnou plochu a množství povrchové chemie, která podporuje buněčnou adhezi, růst, migraci a diferenciaci,
- degradaci nosiče, která bude nejvíce korespondovat s regenerací požadované přirozené tkáň.

Elektrostatické zvlákňování produkuje vlákna v průměru od desítek mikronů až jednotek nanometrů. Uplatnění elektrostatického zvlákňování v biomedicíně se počítá od roku 1978, kdy se objevila první elastomerní cévní protéza vyrobená z polyuretanového elastomeru metodou elektrospinningu. Základní komponenty při výrobě jsou polymer a zdroj vysokého napětí. Elektrické napětí se generuje mezi zdrojem a kolektorem. Pokud do takto silného elektrického pole dostaneme polymerní roztok nebo polymerní taveninu, náboj na povrchu polymeru se začne kumulovat do té míry, že vytvoří kapičku a překonáním soudržné síly roztoku se polymer v podobě kapalinové trysky začne pohybovat směrem ke kolektoru. Během tohoto pohybu dojde k vypaření rozpouštědla a zpevnění vlákna. Prvním stadiem pro tvorbu nanovláken je tedy vznik Taylorova kužele při překonání soudržné síly povrchového napětí polymeru elektrickou silou. Tento proces výroby většinou produkuje velmi dlouhá vlákna, která se mohou lišit v hodnotě průměru až dvojnásobně po celé délce. Celý proces

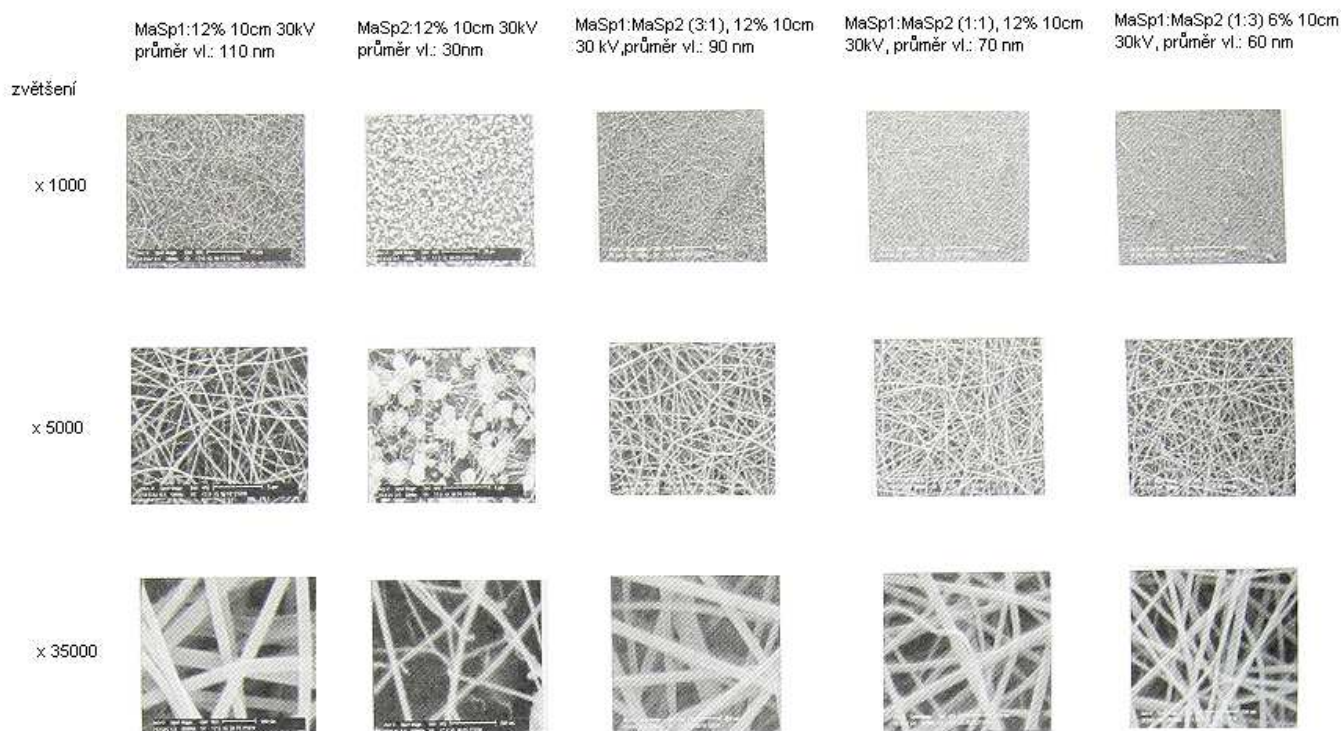
vzniku vlákněné struktury pomocí elektrostatického zvlákňování je dobře patrný na obrázku č.4.



Obr.č.4: Princip elektrostatického zvlákňování [10]

Abychom byly schopni připravovat vlákněné vrstvy s požadovanými morfologickými vlastnostmi, je nutné upravovat podle potřeby vstupní parametry, které je ovlivňují, jako je intenzita elektrostatického pole, vzdálenost mezi katodou a anodou, koncentrace roztoku, viskozita, hustota, typ rozpouštědla, průtok, průměr a úhel natočení zvlákňovací trysky. Jako příklad toho, jak se v závislosti na vstupních parametrech mění výsledná vlákněná vrstva, uvedu zvlákňování hedvábných proteinů MaSp1 a MaSp2 pavouka Nefila kyjonohá v různých poměrech (1:0, 1:1, 1:3, 3:1, 0:1). Elektrostatické pole je drženo na 3kV/cm a vzdálenost elektrod je 10cm. Koncentrace roztoků se pohybovala mezi 6 % - 12% , tak aby vzniklá vlákna byly trvalá a stejnoměrná. Na obrázku č.5 jsou uvedeny jak vstupní parametry tak produkty výroby. Jednotlivé vlákněné vrstvy je možné vidět ve třech rozlišení 1000x, 5000x a 35 000x. Už na první pohled jsou zjevné rozdíly v průměrech vláken a porovitosti jednotlivých struktur a to se měnily pouze objemové podíly jednotlivých složek ve směsi. Představte si nyní kolik možných variant se nám nabízí při výrobě scaffoldů elektrostatickým zvlákňováním, kolik různých kombinací a změn vstupních podmínek můžeme udělat a jaké vlákněné struktury budeme mít k dispozici. [2]

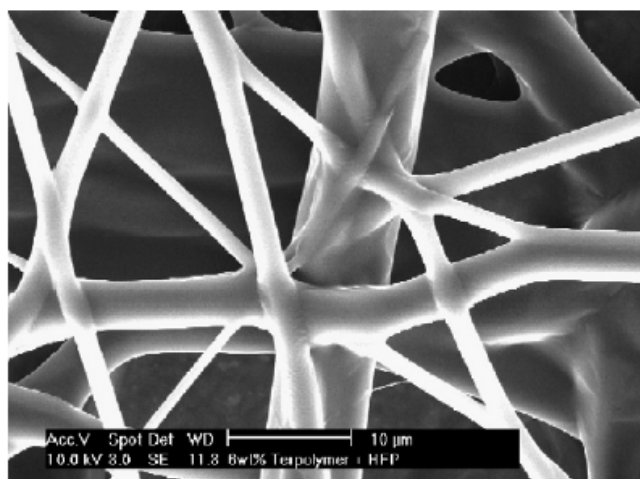




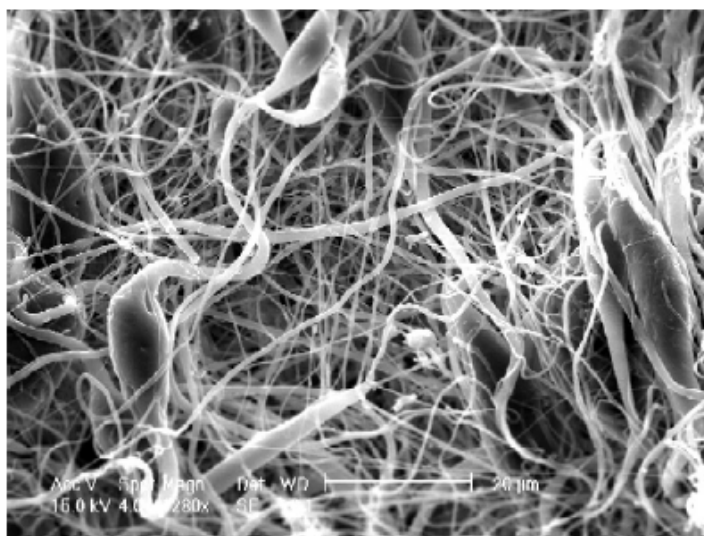
Obr.č.5: Ukázka scaffoldů vyrobených elektrostaticky při různých poměrech dvou stejných složek. [2]

### 2.3.1. Povrchová morfologie

Jak už bylo řečeno, buňky jsou citlivé na morfologii nosiče, i když přesné důvody nejsou dosud zcela jasné. Hledání vhodného povrchu je tudíž aktivním tématem současného výzkumu. Jednou z možností získání trojrozměrné sítě je polymer s vysokým obsahem rozpouštědla. Rozpouštědlo se během procesu nestačí odpařit a po dopadu se vlivem ještě tekutého povrchu nalepí na již vytvořená vlákna (viz.obrázek č.6). Další možná morfologická podoba povrchu scaffoldu je vznik tzv. korálků po délce vlákna. Vznik takové to formy korálku je přičítáno složité interakci mezi viskozitou roztoku, hustotou náboje a povrchovým napětím.(viz.obrázek č.7). Vliv této anomálie na přilnavost a buněčný růst není zatím prokázán. Každopádně to otvírá další možný parametr konstrukce. Z praktického hlediska je jeden problém zjevný. Při počítání buněk pomocí optické nebo scanovací elektronové mikroskopie může velice snadno dojít k záměně korálku za buňku, díky které by výsledky testů funkčnosti a použitelnosti nosiče byly značně zkreslené. [11]



Obr.č.6: Vlákna obsahující vysoké koncentrace rozpouštědel mohou tvořit mechanická spojení s jinými vlákny v jejich přechodech. Tím se vytvoří trojrozměrná síť. [11]

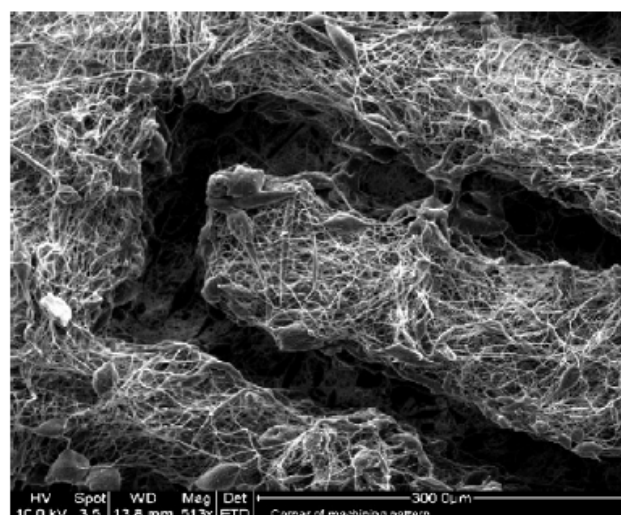
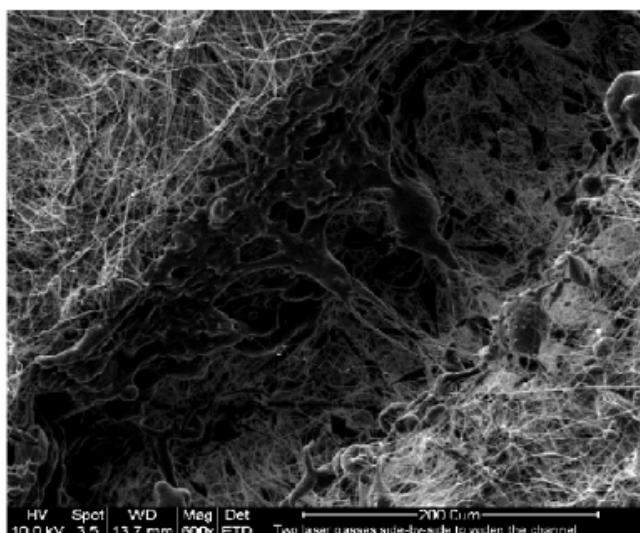


Obr.č.7: Korálky vytvořené elektrostatickým zvlákňováním vlivem kapilární nestability. [11]

Nevýhodou elektrostatického zvlákňování jsou vysoké náklady na výrobu, i když zařízení na výrobu je relativně levné. Práce s drahými surovinami jako je PLA a PLGA (dostupnější je jen polykaprolakton) a hlavně s růstovými faktory a současně ne vždy zaručená požadovaná výsledná podoba scaffoldu, to vše snižuje efektivitu výroby a celý

proces prodražuje. Zlepšení kontroly ukládání vláken na povrch se provádí např. pomocným elektrickým polem, které celý proces více usměrňuje.

Dalším významným činitelem struktury je velikost porů a jejich počet. Obecně je známo, že scaffoldy vyrobené elektrostatickým zvlákňováním mají póry příliš malé a je nutné začlenit do procesu výroby takové elementy, které nám požadovanou velikost porů zajistí. Jako příklad uvedeme začleňování krystalků soli během procesu, kdy po dokončení dojde k jejich rozpuštění. Ovšem jedná se o metodu nepřesnou a to v rovnoměrném rozmístění těchto dutin. Další velice diskutovaná metoda je vytváření dutin a kanálů v již hotovém nosiči pomocí pulzního laseru (viz obrázek č.8). Je na něm dobře patrné, že na rozhraní vláken a dutiny nedošlo ke změně charakteru vláken a k žádným deformacím, které by nosič znehodnotily.



Obr.č.8: Nosiče upravené pomocí pulzního laseru. [11]

### 2.3.2. Zbytková rozpouštědla

Elektrostatické zvlákňování používá roztok polymeru v rozpouštědle. Některá rozpouštědla mohou být uchovány ve výsledném polymeru vlákniny a mít tak jistý vliv na biologický vývoj substrátu ať už příznivý nebo nepříznivý. Jako příklad uvedeme kolagen

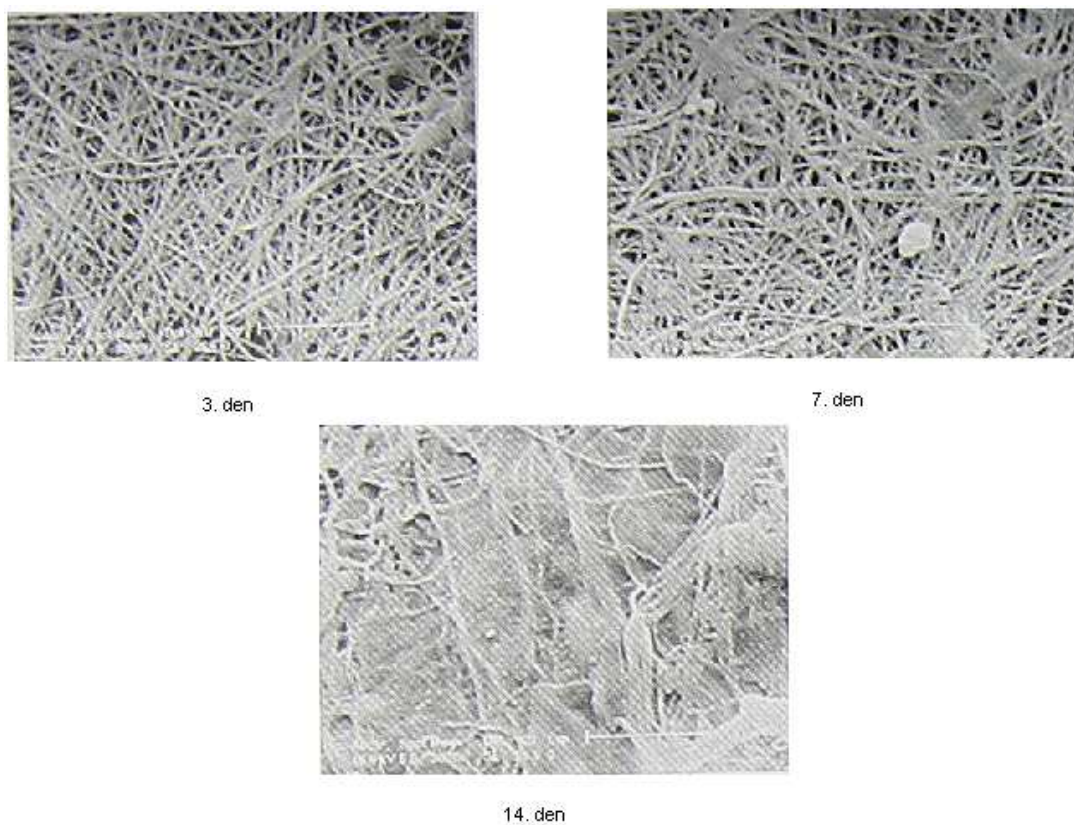
typu I, který se pro zvlákňování musí rozpustit v hexafluoropropanolu ( HFP ). Výsledná nanovlákná mohou obsahovat až 1600 ppm zbytkového rozpouštědla. Negativní vliv HFP na buněčné kultury je prokázán. Následné sušení ve vakuu snížilo toto množství na 100 ppm. Ovšem, zda je tato hodnota na tak nízké úrovni, že nám eliminuje nežádoucí účinky na buňky, to zatím není zcela jasné. Naštěstí se v dnešním výzkumu používají více benigní rozpouštědla jako je aceton, které se dají snadněji odstranit. [12]

### **2.3.3. Začleňování bioktivních látek do struktury**

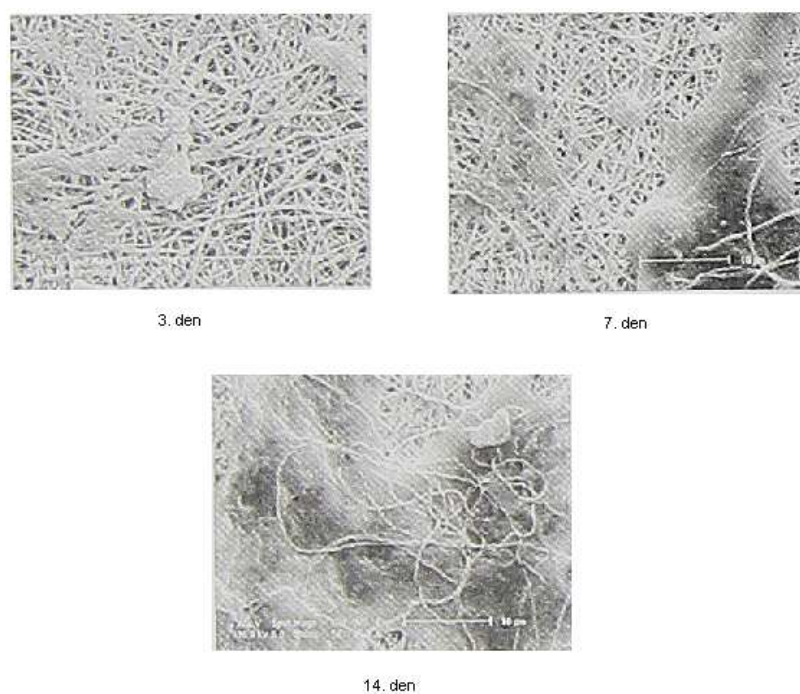
Zatímco scaffoldy vyrobené elektrostatickým zvlákňováním jsou morfologicky velmi zdařilé, nelze už tak pozitivně mluvit o chemické podobnosti s lidskou tkání. Snaha zvýšit životaschopnost těchto nosičů pomocí biomolekul zanesených do struktury lešení je na místě. Tyto částice se musí zanést do vnitřní struktury scaffoldu tak, aby příliš nezměnily tvar a morfologii nosiče. Navíc je žádoucí výskyt těchto částic pouze uvnitř nosiče, nikoliv na povrchu, kde by mohly negativně působit na růst a množení buněk. [11]

### **2.3.4. Nanokompozitní vlákna**

Další cestou k získání nosiče věrně napodobující strukturní a mechanické vlastnosti přírodního extracelulárního matrixu je spojení dvou materiálů v jednom lešení. Pomocí co – elektrospinningu, kde se zvlákňují směsi dvou různých materiálů, můžeme získat scaffold neobyčejných vlastností. V současné době se výzkum zaměřuje na nanokompozitní vlákna vyrobené z uhlíkových nanotubic (CNT). Tyto trubice vlastně představují vrstvy grafitu válcového tvaru. Začlenění CNT do polymerního nebo přírodního lešení vede nejen ke zlepšení mechanických vlastností, ale i k unikátní elektrické vodivosti. Jaký vliv má začlenění 1 % CNT ve scaffoldu z přírodních hedvábí v průběhu 3, 7, a 14 dní můžeme vidět na následujících obrázcích č.9 a č.10. Třetí den je už možné sledovat buňky propojené s lešením, scaffold výborně poskytuje podporu pro jejich množení a pohyb. Sedmý den je vidět znatelné zvýšení populace, propojovací mosty napříč vlákenným lešením. Poslední den pokusu již lešení zmizelo pod vrstvou nové tkáně. Pro lepší srovnání a hodnocení nanokompozitních scaffoldů a jejich vliv na kultivaci in vitro přikládám stejný pokus bez procentního zastoupení druhé složky. [2]



Obr.č.9: Buněčná morfologie po 3,7 a 14 dnech na scaffoldech z přírodních hedvání. [2]

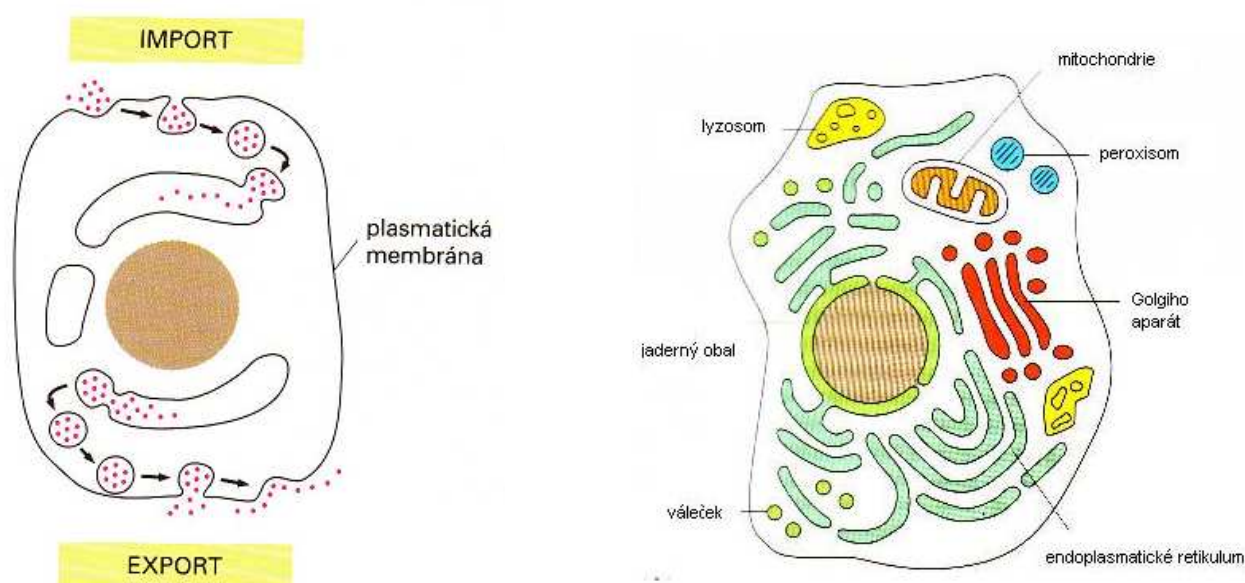


Obr.č.10: Buněčná morfologie po 3,7 a 14 dnech na scaffoldech z přírodního hedvání a 1% CNT. [2]



## 2.4. Tkáň

Buňky jsou základní stavební jednotky mnohobuněčných organismů. Zatímco buňky mohou být složkami větších živých organismů, nic menšího než buňka nemůže být skutečně nazváno živým. Buňky se rozděluje na eukaryotické a prokaryotické podle toho, jestli obsahují nebo neobsahují jádro. Přítomnost jádra jde ruku v ruce s přítomností řady dalších organel. Jádro je obvykle nejdůležitější organelou v buňce. Na povrchu je kryto dvěma vrstvami soustředných membrán a uvnitř obsahuje velmi dlouhé polymery molekul DNA. Nejnápadnější organelou v buňce je mitochondrie. Opět je chráněna dvěma vrstvami, z nichž vnitřní je zprohýbaná. Mitochondrie obsahuje svou vlastní DNA a rozmnožují se dělením. Jejich hlavní funkcí je získávání energie z potravy a produkce základního chemického paliva pro buňky - adenosintrifosfát (ATP). Při této činnosti spotřebovávají kyslík a produkují oxid uhličitý. Cytoplazma vyplňuje vnitřek buněk a obsahuje i další řadu organel, které většinou souvisí s importem a exportem látek. Mezi endoplazmatickým retikulem, Golgiho aparátem a lyzosity spolu s vnějším obalem buňky probíhá stálá výměna materiálu. Tato výměna je zprostředkována malými váčky, které neustále fúzí od membrány jedné organely k jiné. Tyto váčky nakonec splývají s lyzosity kde je materiál tráven. Tímto způsobem se provádí i opačný proces, při kterém váčky uvolňují odpadní produkty do vnějšího prostředí. (obr.č.11) [13]

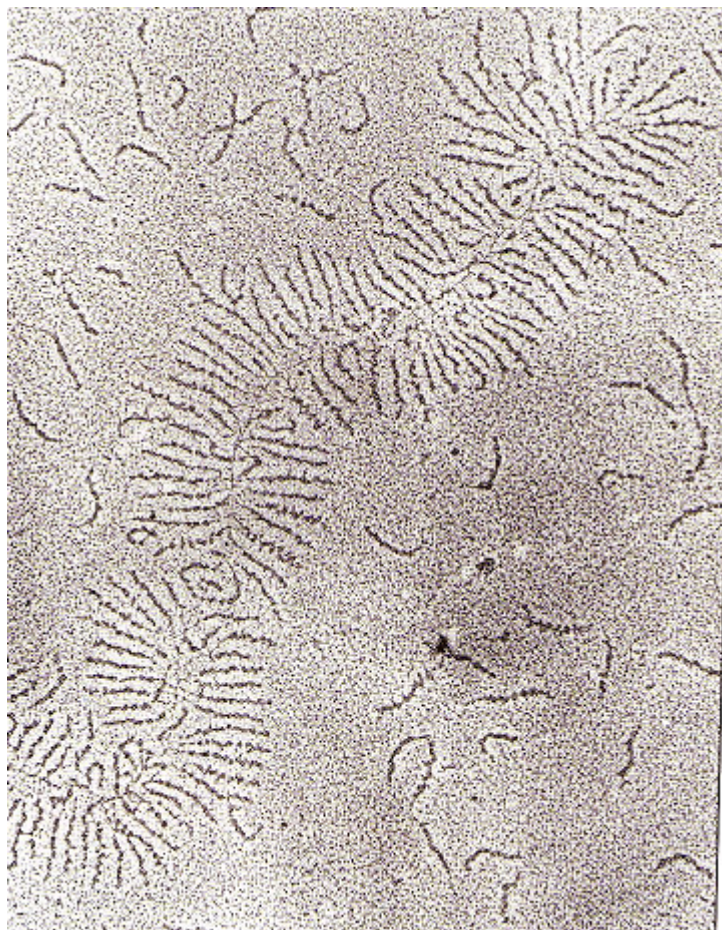


Obr.č.11: Import a export materiálu do buňky a vnitřní trávení. Vnitřní membrány a cytosol eukaryotní buňky. [7]

V lidském těle existují 200 druhů buněk. Jsou uspořádány do různých typů tkání jako je epitel, pojivová tkáň, sval a nervová tkáň. Pojivová tkáň se skládá z mezibuněčné hmoty a z buněk, které jí produkují. Mezibuněčná hmota je tvořena proteinovými vlákny - kolagenem a elastinem, množstvím přesahuje množství buněk v ní. Téměř veškeré pojivové tkáně procházejí stádiem primitivního embryonálního vaziva neobsahujícího fibrily, pouze buňky - mezenchymem. Z něho se pak vyvíjejí tři hlavní typy pojivové tkáně - vazivo, chrupavka a kost. Buňky, které se vyskytují v ECM a vytvářejí ji, se nazývají různě podle druhu tkáně. V kůži a šlachách fibroblasty, v kostech osteoblasty a v chrupavce chondrocyty( chondroblasty )

Specifické vlastnosti jednotlivých typů pojivových tkání jsou dány typem kolagenu, které obsahují, jeho množstvím a dalšími molekulami, které jsou s ním protkány v různých směrech. Kolagen poskytuje pojivovému tkánímu pevnost v tahu. Typickým znakem kolagenové molekuly je dlouhá trojřetězcová struktura obsahující tři kolagenové polypeptidické řetězce kolem sebe obtočené. Tyto molekuly vytvářejí kolagenní fibrily a jejich shluk mnohem silnější kolagenová vlákna. Aby mohly kolagenové fibrily vykonávat svoji funkci, musí být správně uspořádány. Toto uspořádání se s ohledem na danou pojivovou tkáň mění, tak aby splňovala příslušnou pevnost, odolnost a elasticitu, která je vyžadována. Buňky tuto orientaci v průběhu vývoje tkáně regulují vhodným ukládáním kolagenu, pohybují se po něm, napínají ho a pomáhají ho zpevnit. Pokud se ovšem buňky pohybují po ECM musí být schopny se k němu i přichytit. Toto spojení zajišťuje protein zvaný fibronectin. [7]

Další složkou ECM jsou proteoglykany. Pokud kolagen zajišťuje pevnost, proteoglykany pružnost. Důmyslně vyplňují prostor kolem buněk tak, aby nedošlo k jejich stlačení. Jsou extrémně různorodé ve tvaru, velikosti a chemickém složení. Obecně jsou velmi hydrofilní, zaujímají velký prostor vzhledem k své hmotnosti. Kromě hydratovaného prostoru kolem buněk mají i jiné funkce například gely s různou velikostí pórů regulující průchod buněk skrz extracelulární matrix. Mohou vázat růstové faktory a jiné důležité proteiny. Po chemické stránce se jedná o proteiny připojené ke speciálnímu druhu komplexů polysacharidů tzv.glukosaminoglykanů (GAG). Relativně jednoduchý GAG je kyselina hyaluronová, na kterou se nekovalentně váže asi 200 proteoglykanů a společně vytváří proteoglykanové agregáty ( obr.č.12) [7]



Obr.č.12: Proteoglykanový agregát z chrupavky zachycený na SEM. Obrovské makromolekuly vypadají podobně jako štětky na čištění lahví. [7]

#### 2.4.1. Kloubní chrupavka

Kloubní chrupavka je velice houževnatou a odolnou tkání. Dokáže dlouhodobě odolávat cyklickému zatížení, snese vysoký kontaktní tlak odpovídající čtyřnásobku tělesné hmotnosti. Hlavní funkci chrupavek je schopnost pohybu kostí v kloubních jamkách a zabránění degradace kostí nárazem a nadměrným třením při zátěži. Kloubní chrupavka představuje specializovanou tkáň, ve které má mezibuněčná hmota pevnou konzistenci. Radíme ji mezi chrupavky hyalinní, které neobsahují ani nervy ani cévy. Na povrchu se nachází vrstva polysacharidů tzv. chondrální membrána, která má funkci lubrikantu a snižuje tření. Kloubní chrupavka ve svém obvodu nasedá na synoviální membránu kloubního pouzdra, která produkuje synoviální tekutinu. Tekutina je čirá, bezbarvá nebo jen lehce



nažloutlá. Obsahuje kyselinu hyaluronovou, která svým obsahem ovlivňuje vizkoelasticitu. Synoviální membrána obsahuje cévy a nervy a její podráždění je bolestivé. Chrupavka je velice citlivá na bakteriální infekce v důsledku čehož dochází velice rychle k její destrukci i kloubu. Výživa chrupavky je zajištěna jednak ze synoviální tekutiny a dále ze subchondrálních cév. Pro chrupavku je typická nízká koncentrace kyslíku a anaerobní metabolismus, který vede ke zpomalení regeneračních procesů. Poškození chrupavky se pak hojí řadu měsíců. [14]

### ***Složení chrupavky***

Po chemické stránce tvoří chrupavku ze 60 % voda a zbytek kolagen, proteoglykany, kyselina hyaluronová a glykoproteiny. Po stránce strukturní je tvořena buňkami chondrocytů, které zajišťují vnitřní stabilitu extracelulární matrix a také jí vytváří.

Jak už bylo řečeno kolagen ve formě vláken a fibril tvoří síťovinu, která vytváří celkový tvar chrupavky. Tato síť je z 80% tvořena kolagenem typu II. Zbytek tvoří kolagen typu IX zajišťující stabilitu a ukotvení proteoglykanů v síti a kolagen typu VI.

Proteoglykany chrupavky obsahují chondroitin-4-sulfát, chondroitin-6-sulfát a keratansulfát. Pro chrupavku nepostradatelný proteoglykan se nazývá agrekan. Jeho molekuly jsou imobilizovány v síti kolagenních fibril. Agrekan patří mezi proteiny vážící se na kyselinu hyaluronovou. Tyto velké makromolekuly zvyšují odolnost tkáně proti tlaku a zlepšují pružnost. Kyselina hyaluronová se dále vyskytuje volně v synoviální tekutině a zvyšuje tak viskoelasticitu vnitřního prostředí.

K zástupcům glykoproteinů patří spojovací protein fibronektin a chondronektin. Všechny tyto makromolekuly zajišťují přilnavost chondrocytů ke kolagenu ECM. [14]

### ***Struktura chrupavky***

Kloubní chrupavku lze rozdělit do několik oblastí. Podle místění na část povrchovou, střední a spodní část. Každá oblast má jinou morfologii, nejsou mezi sebou ostře ohraničeny a tudíž se vzájemně prolínají. Buňky v jednotlivých oblastech se neliší jen tvarem a velikostí, ale i orientací v povrchu a metabolickou aktivitou. Při pohybu dochází u vrchní vrstvy k deformaci v závislosti na směru pohybu stejně jako v menší míře střední část, zatím co spodní část struktury zůstává zachována. [14]

Povrchová oblast:

Na povrchu této vrstvy se nachází chondrální membrána, která zabraňuje přímému kontaktu chondrocytů s povrchem kloubu. Pod touto membránou se nachází ploché chondrocyty. Mají tvar elipsy a uloženy jsou svojí nejdelší osou paralelně k povrchu. Tyto chondrocyty produkují matrix bohatý na kolagen a chudý na proteoglykany. Kolagenní fibrily jsou malé a orientovány stejně jako buňky, čímž společně vytvářejí oblast odolnou v tahu. [14]

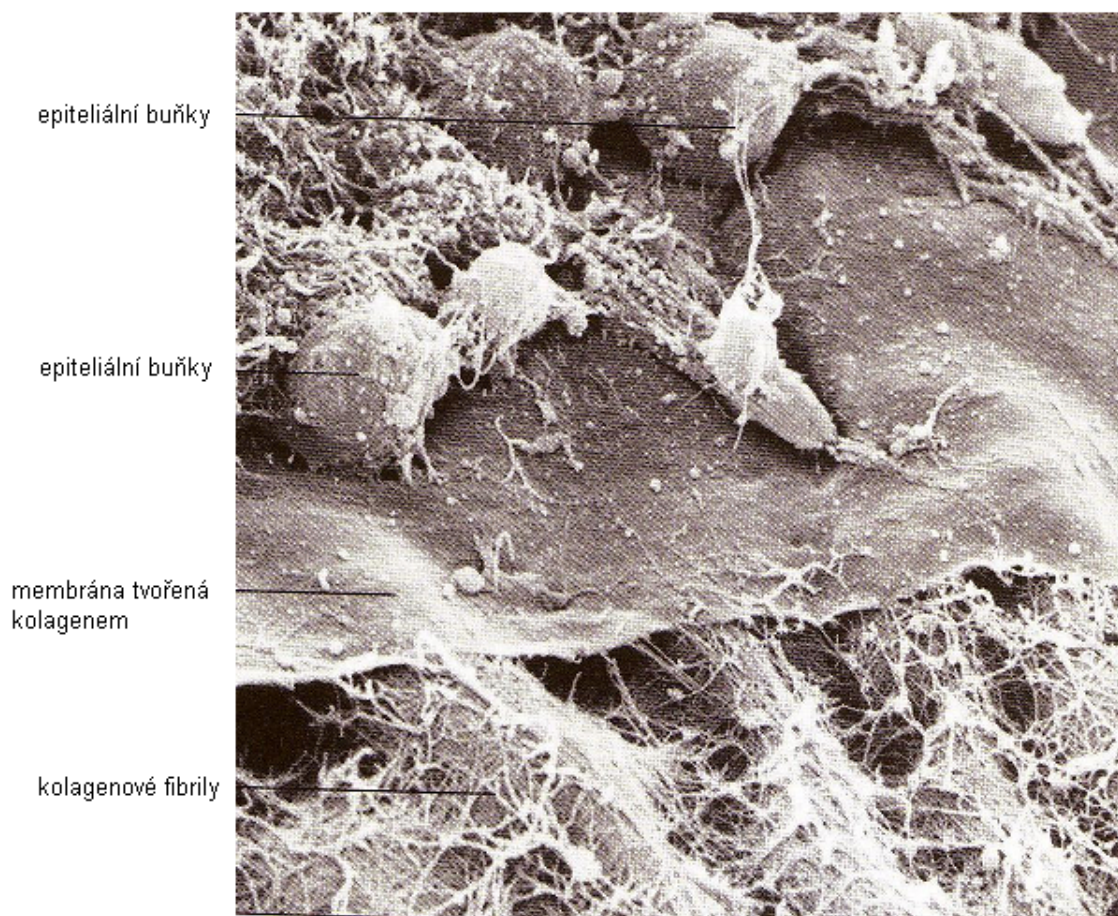
Střední oblast:

Buňka této oblasti mají sférický tvar, obsahují velké množství syntetických organel, endoplazmatického retikula a dobře vyvinutý Golgiho komplex. Kolagenní fibrily jsou velké a orientovány tangenciálně k povrchu. Matrix obsahuje hodně proteoglykanových agregátů. [14]

Spodní oblast:

Je to hluboká oblast a její buňky produkují dlouhé kolagenní fibrily, které jsou orientovány radiálně k povrchu. V této vrstvě je vysoké procento proteoglykanů, vůbec nejvyšší koncentrace agrekanu. Tato vrstva spolu se střední oblastí nejlépe odolává tlaku a zátěži při dopadu. [14]

Závažná poškození chrupavky kolena představují dnes stále nedořešenou otázku v oblasti traumatologie a ortopedie. Těžké poškození kloubní chrupavky v mladém věku, v plné tloušťce a v zátěžovém místě nosných kloubů, může odstartovat a urychlit rozvoj degenerativních procesů v kloubu a v neposlední řadě vést až k rozvoji osteoartrózy. Osteoartróza je proces přímo vedoucí k degeneraci kloubu změnami v kloubní chrupavce. Z počátku změny v elasticitě chrupavky, později dochází k takovým změnám, které vedou k poškození kloubu. V konečné fázi rozvoje artrózy dochází k totální degeneraci chrupavky. V současné době je postižena osteoartrózou 10% naší populace. [14]



Obr.č.13: Bazální membrána rohovky kuřecího embrya na fotografii z řádkovacího elektronového mikroskopu. [7]

## 2.4.2 Hrtan

Hrtan je nepárový dutý orgán, sloužící k dýchání a tvorbě hlasu. Podkladem hrtanu je soubor chrupavek, pohyblivě spojených klouby a svaly tak, že vzniká charakteristicky utvářená trubice s výstelkou sliznice. Chrupavky tvoří skelet hrtanu a patří k nim nepárová chrupavka štítná, nepárová chrupavka prstencová, dvě chrupavky hlasivkové, chrupavka příklopy hrtanové a další menší chrupavky. Svaly hrtanu jsou příčně pruhované ovládající pohyby chrupavek hrtanu. Dále určují napětí hlasových svalů a šířku štěrbiny mezi nimi. [15]

Hrtanové chrupavky je souhrnné označení chrupavek, které obklopují a chrání hrtan. Příklopková chrupavka je nepárová chrupavka protáhlého tvaru. Její základ tvoří elastická

chrupavka, které má kromě základního složení navíc i elastin. K hlavní funkci dochází při polykání, kdy se přikládá na vstup hrtanu, a zamezuje tím vdechnutí potravy a tekutin do plic.

Chrupavka štítná je nepárová hyalinní chrupavka, která tvoří poměrně velké útvar vpředu obepínající a chránící hrtan. Skládá se z levé a pravé ploténky vpředu spojené tak, aby vytvářeli oblou hranu nazývanou ohryzek. Ve stáří tako chrupavka charakteristickým způsobem kostnatí a míra tohoto kostnatění může sloužit jako vodítko k určování stáří.

Prstencová chrupavka je hyalinní nepárová chrupavka vodorovného tvaru, která má nejen ochrannou funkci, ale navíc umožňuje připevnění svalů a vazů. V horní části je skloubena s chrupavkou štítnou, v dolní části se nachází kloubní plochy pro kontakt s hlasivkovými chrupavkami, které jsou párově a mají tvar trojbokého jehlanu. Drobné chrupavky hrtanu jsou připojeny vazivem k hlavním chrupavkám nebo jsou vloženy ve vazivech. Mohou být hyalinního i elastického typu. [16]

### 2.4.3 Artérie

Artérie neboli tepny jsou cévy, které vedou krev směrem od srdce, mají pevné a pružné stěny, které jim umožňují pojmout množství krve rytmicky vypuzované ze srdce. Tepny jsou uloženy hlouběji, v chráněných místech, až na některá místa, kde je možné nahmatat tep. Stěna každé tepny má tři vrstvy: vnitřní Tunica intima, střední Tunica media a vnější Tunica externa. [17]

Tunica intima je vnitřní vrstva a skládá se z jedné vrstvy epitelových buněk podložených sítí elastických a kolagenních vláken. V některých tepnách je mezi epitelem a sítí vláken vložena vrstva vaziva.

Tunica media je nejsilnější vrstvou a je tvořena hladkou svalovinou. Mezi buňkami jsou opět kolagenní a elastická vlákna. V závislosti na velikosti tepny jsou poměry buněk a vláken různé. Velké tepny jsou elastického typu, ve středně velkých je poměr obou složek v rovnováze a v menších tepnách převažuje svalovina.

Tunica externa je vnější vrstva a vytváří povrch tepny. Ten je tvořen fibrilárním vazivem s kolagenními a elastickými vlákna. Vlákna se na povrchu kříží a přecházejí do vaziva v nejbližším okolí cévy, čímž jí pružně fixují.

Protože stěny tepen jsou poměrně silné, není možné jejich zásobení kyslíkem a živinami zajistit jenom průtokem krve a difúzí stěnou. Zásobování kyslíkem a živinami proto zajišťují slabé tepénky, odvod tenoučké žilky, které probíhají v cévních stěnách. [18]

## 2.5 Stereologie

Termín stereologie pochází z řeckého výrazu στερεός, což je možné překládat jako tuhý, pevný, prostorový. I přesto, že se rozvoj tohoto oboru zaznamenává až od počátku 60.let 20.století, kořeny této vědní disciplíny sahají mnohem hlouběji a její vývoj se úzce kryje s vývojem ostatních kvantitativních metod. Stereologie vychází s geometrie, jejíž poznatky se aplikují na analýzu různorodých vzorků. Jedním z hlavních problémů, kterým se stereologie při svém rozvoji zabývala, byly diskuze nad možnostmi kvantitativního hodnocení trojrozměrných objektů na základě studia jejich dvojrozměrných řezů. Odvozování geometrických vlastností hodnocených struktur na základě aplikací testovacích sond, se stalo základem tohoto vědního oboru. [19]

Šedesátá léta jsou považována za začátek novodobé historie stereologie. Pomocnou ruku této vědní disciplíně podaly i jiné obory, které zaznamenali v té době velký rozmach. Lepší dostupnost kvalitativní optiky, rozvoj imunocytochemie a elektronové mikroskopie a mnohé jiné zajistili výborné podmínky pro rozvoj stereologie. Své aplikaci si rychle nacházely uplatnění v minulosti již popsané postupy. K těm nejvýznamnějším osobám řadíme Bonaventuru Cavalieriho, který v roce 1637 formuloval postup, jak na základě součtů ploch, které zaujmají tělesa v ekvidistantních řezech, odhadnout střední objem tělesa. Cavalieriho princip říká, že mají-li dvě tělesa stejnou základnu a stejný profil na řezech paralelních se základnami v téže výšce, jejich objem je totožný. Další významná osobnost byl hrabě George-Louis Leclerc Buffon, který roku 1733 popsal vztah mezi pravděpodobností vzniku průsečíků náhodně hozené jehly na systém rovnoběžných čar, délku takovéto jehly a vzdálenost jednotlivých rovnoběžek. V modifikované podobě se tento princip používá pro odhad plochy a délky objektů. Odhadem objemových frakcí na základě plošných podílů těchto částí na řezech se zabýval významný geolog Achille Delesse, který v roce 1847 tento postup podrobně popsal. O půl století později byl tento postup doplněn o tzv. Rosiwalovo pravidlo usnadňujícím odhad plošných podílů pomocí délkových podílů. [20]

### 2.5.1 Přehled sond a kvantifikovaných veličin

Při aplikaci stereologických postupů založených na statistickém odvozování geometrických vlastností hodnocených struktur a objektů z aplikace bodových, lineárních, rovinných a či objemových testovacích sond, je nejprve potřeba zvolit testovací systém. Při

měření vybrané části objektu je usnadněno použitím testovacích systémů tvořených periodicky uspořádanými testovacími sondami. Testovací sonda může být tvořena bodem, obloukem nebo obrazcem a principem měření je záznam o počtu průsečíků daným objektem a testovací sondou. [21]

Pro správně zvolený postup je zapotřebí držet se určitých pravidel mezi dimenzemi testovacích sond a kvantifikovaných veličin. Především součet dimenzí veličiny a stereologické sondy je vždy roven třem, co je vlastně celkovým počtem dostupných dimenzí ve tkáni. Jako příklad uvedu např. počítání buněk. Kdybychom totiž počítali jednotlivé buňky jako body (což je rozměr 0 –D) v rovině řezu tkání, což je dvojrozměrný útvar, došli bychom k součtu 2 a to je menší nežli 3 dimenze skutečné tkáně obsahující buňky. Není možné při vyhodnocování zanedbávat trojrozměrnost preparátu i přes to, že v laboratorním měřítku vnímáme obraz preparátu jako dvojrozměrný. V následující tabulce č.1 jsou přehledy jednotlivých dimenzí a jím odpovídající kvantifikované veličiny:

Dimenze geometrické sondy	Dimenze kvantifikované veličiny
Bod ( $L^0$ )	Objem ( $L^3$ )
Linie ( $L^1$ )	Plocha povrchu ( $L^2$ )
Rovina ( $L^2$ )	Délka ( $L^1$ )
Objem ( $L^3$ )	Počet ( $L^0$ )

Tab.č.1: Přehled dimenzí. [22]

Při aplikaci stereologických sond na hodnocené vzorky je zapotřebí zachování určité náhodnosti a tato náhodnost musí být ve smyslu vzájemné pozice (posunu), tak ve smyslu vzájemné orientace sond a preparátu. Do konce 80.let minulého století se používaly stereologické metody založené na modelových předpokladech o velikosti, tvaru a orientaci testovaných objektů. Reálné vzorky byly idealizovány a připodobňovány modelovým vzorům. Odchyly od těchto modelů byly poté korigovány konstantami a korekčními faktory. Od 80.let přichází na řadu stereologické metody založené na vhodném designu aplikované metody, které jsou založeny na vhodném vzorkování hodnocených mikroskopických částí objektů. Strategie nestranného vzorkování sond vůči vzorkům je základem těchto metod a stalo se „zlatým standardem“ pro většinu aplikací stereologie.

Při popisu vnitřní struktury objektu je důležité vycházet z rovnoměrně náhodných a izotropních řezů. Z těchto řezu poté pořizujeme mikrosnímky, na kterých provádíme měření

pomocí dvourozměrných testovacích systémů. Systémem pohybujeme v řezu tak, aby zvolený bod v objektu procházel jedinou základní oblastí testovacího systému. Pootočení mřížky provádíme současně při každé poloze zvoleného objektu tak, aby byla mřížka izotropně náhodná vzhledem k řezu. [22]

### 2.5.2 Poměry a hustoty

Další formou jak vyjadřovat stereologické výsledky jsou vzájemné poměry, k nimž nejčastěji patří :

Objemový podíl  $V_v$ , což je podíl vybrané vybraného objektu v referenčním objemu

Povrchová hustota  $S_v$ , což je plocha povrchu vztažená na jednotku objemu ( $\text{mm}^{-1}$ )

Délková hustota  $L_v$ , což je lineární délka vztažená na jednotku objemu ( $\text{mm}^{-2}$ )

Numerická hustota  $N_v$ , což je počet objektů nacházející se v jednotce objemu ( $\text{mm}^{-3}$ )

Pokud bychom měly hodnotit výsledky měření pomocí odhadů, vyvstává nám na mysl otázka případných chyb a odchylek, kterých bychom se mohli dopustit. Především se jedná o preparaci a fixaci vzorků řezů, které zaléváním do parafínu nebo klimatickými změnami, mohou měnit tvar a zkreslovat tím poměrové hodnoty jednotlivých složek. Proto je velice důležité, aby byl referenční prostor předem znám, nikoliv měřen. [23]

### 2.5.3 Odhad délek lineárních struktur ve 2-D

Toto je metoda, kterou budeme používat v experimentální části pomocí programu Ellipse, kde bude v odstavci podrobně popsána. Jedná se o modifikovanou Buffonovu úlohu, při níž je délka objektů odhadována z počtu průsečíků testovaného systému. Hodnotu celkové délky pak můžeme použít pro výpočet délkové hustoty podle rovnice:

$$L_A = \frac{L}{A}, \quad (2.1)$$

kde  $L_A$  je délková hustota,  $L$  je naměřená délka vláken a  $A$  je referenční plocha měření.

Rovnice pro výpočet délky pomocí modifikované Buffonovy úlohy je :

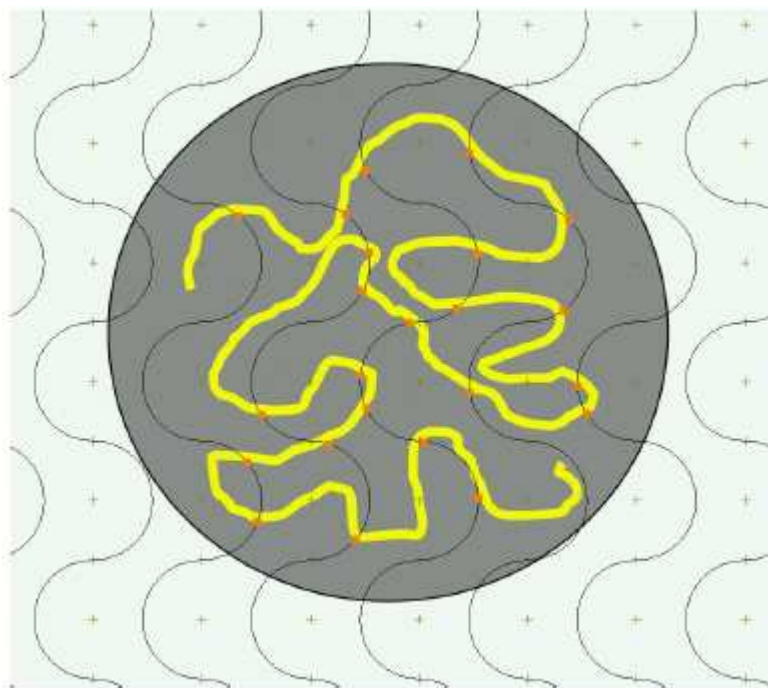


$$\hat{L} = \frac{\pi}{2} \times \frac{a}{l} \times \sum I, \quad (2.2)$$

Kde  $L$  je délka objektů odhadována z celkového počtu průsečíků  $\sum I$  testovacího systému s hodnocenými vláknitými objekty. Mřížková konstanta  $\frac{a}{l}$  je poměr plochy a délky jednotkového tvaru testovacího systému a pro cirkulární testovací mřížku činí:

$$\frac{a}{l} = \frac{2d}{\pi}. \quad (2.3)$$

Na obrázku č.14 je znázorněná 2 – D izotropní a náhodně posunutá cirkulární testovací mřížka, kde je vidět 23 průsečíků vláknenného systému testovací sondou. [22]



Obr.č.14: Ukázka aplikace cirkulární testovací mřížky na vláknenný systém. [22]

## 2.5.4 Anizotropie

Než se budeme blíže zabývat metodami určování směrové orientace, zastavme se na chvíli u pojmu anizotropie. Anizotropie je jev, kdy zkoumaný materiál vykazuje v různých



směrech různé vlastnosti. Jinými slovy mluvíme o nestejnomyšlnosti vlastností v různých směrech souřadného systému, které jsou dány uspořádáním jednotlivých složek (vláken) v materiálu. [24]

Určitý stupeň anizotropie můžeme sledovat u všech textilních struktur a jinak tomu nebude ani u zkoumaných vlákenných systémů. Směrová závislost jednotlivých vlastností se nejlépe hodnotí pomocí grafického znázornění v polárních diagramech. Do jednotlivých směrů vynášíme hodnoty dané vlastnosti. Čím větší jsou rozdíly mezi hodnotami, tím větší je anizotropie.

Anizotropie se dá kvantitativně hodnotit parametrem nazývaným stupeň anizotropie  $S_\alpha$ . Hodnotově se stupeň anizotropie vyjadřuje pomocí vzorce :

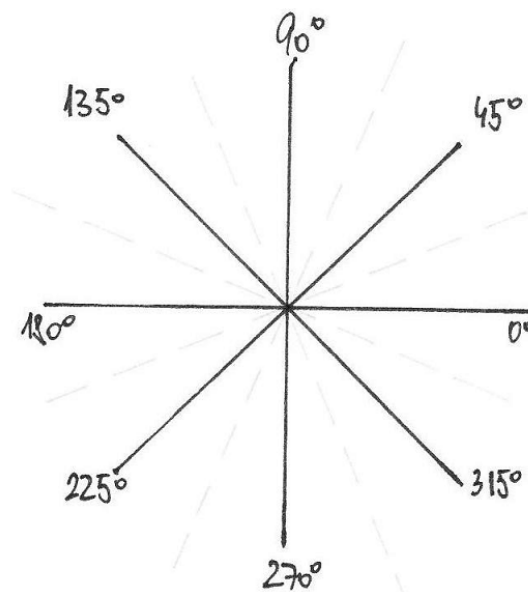
$$S_\alpha = \frac{(V_{\max} - V_{\min})}{(V_{\max} + V_{\min})} \quad (2.4)$$

kde  $V_{\min}$  a  $V_{\max}$  jsou minimální a maximální hodnoty dané vlastnosti. Stupeň anizotropie nabývá hodnot v intervalu (0,1).

V následujícím textu budeme blíže popisovat metody měření směrové orientace pomocí experimentální a spektrální metody a následně těmito metodami vyhodnocovat vlákenné struktury.

### ***Experimentální metoda určování anizotropie***

Postup určování směrové orientace vláken experimentální metodou Steinerova kompaktu pomocí grafické konstrukce směrové růžice začíná vytvořením sítě úhlů, narýsované na transparentní folii. Počet úhlů  $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$  by přitom neměl překročit 18. V opačném případě jsou získané výsledky směrové růžice velmi citlivé na malé změny vstupních dat a metodu tudíž nelze považovat za věrohodnou. Na obrázku č.15 je možné vidět síť úhlů na transparentní folii pro  $n = 4$ .



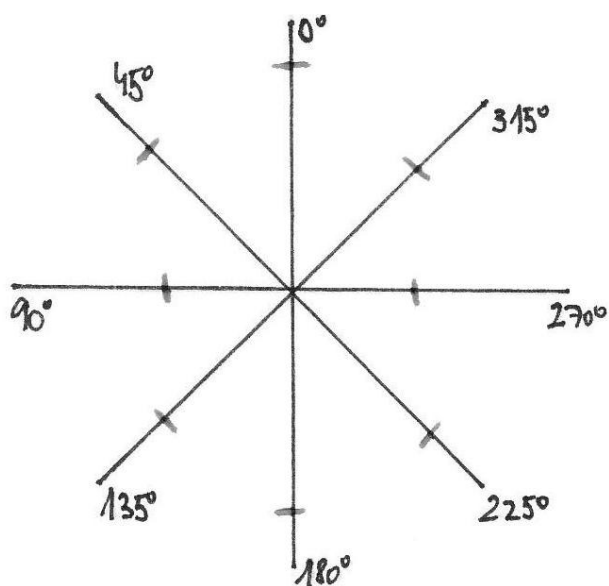
Obr.č15: Sít' úhlů

Sít' úhlů na transparentní folii se postupně přikládala na obraz vláknenného systému a zjišťovalo se počet průsečíků v daném směru. Toto měření se v rámci jednoho snímku provádělo v pravém a levém horním rohu, v pravém a levém spodním rohu a ve středu. Při měření se neměnil ani směr orientace vláken ani sít' úhlů. Výsledky z jednotlivých měření se zaznamenávali do tabulky č.2. V posledním sloupci této tabulky je vždy uveden z jednotlivým měření jejich aritmetický průměr.

	levý horní	pravý horní	levý spodní	pravý spodní	střed	průměr
0°	12	9	7	12	12	10,4
45°	7	8	5	14	13	9,4
90°	2	7	9	8	3	5,8
135°	5	11	9	10	5	8

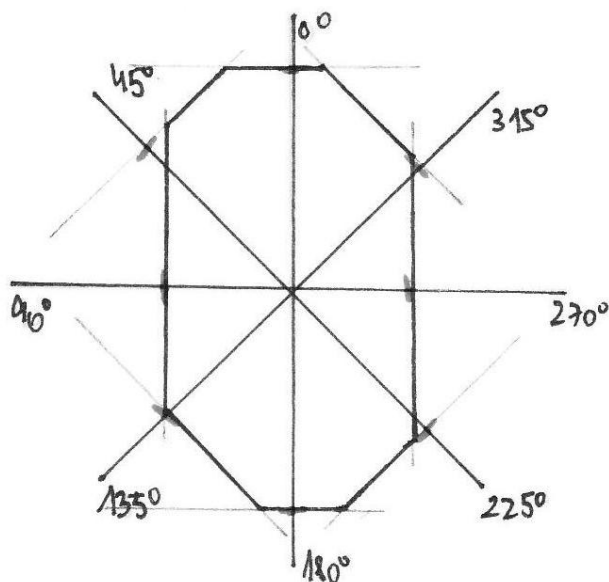
Tabulka č.2 : Počty průsečíků z jednotlivých měření

Výsledný průměr z každého měření se zakresluje do polárního diagramu (do nové sítě úhlů), přičemž je nutné zvolit vhodnou délkovou jednotku. Polární diagram se oproti předchozí síti úhlů pootočí o  $\pi / 2$  a vznikne tak průsečíková růžice zobrazená na obr.č.16



Obr.č.16: Průsečíková růžice

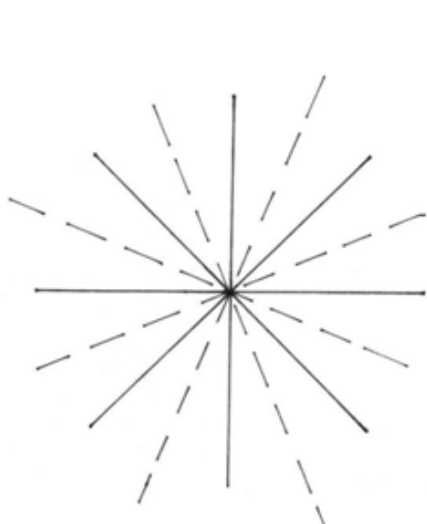
V každém koncovém bodě růžice se vztyčí kolmice, která spolu s ostatními vytváří mnohoúhelník. Tento mnohoúhelník musí být konvexní a středově symetrický. Tento mnohoúhelník jak je vidět na obrázku č.17 se nazývá Steinerův kompak



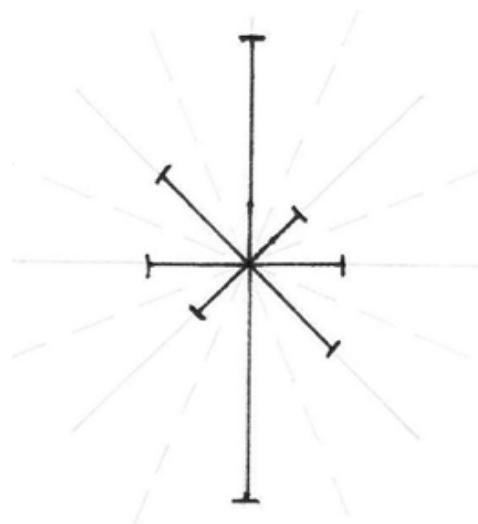
Obr.č.17: Steinerův kompak

Vzdálenosti jednotlivých vrcholů mnohoúhelníka určují velikosti texturních funkcí ve směrových růžicích a to ve stejných směrech. Pro lepší orientaci jsou shodné hodnoty v mnohoúhelníku a směrové růžici označeny stejnou barvou.

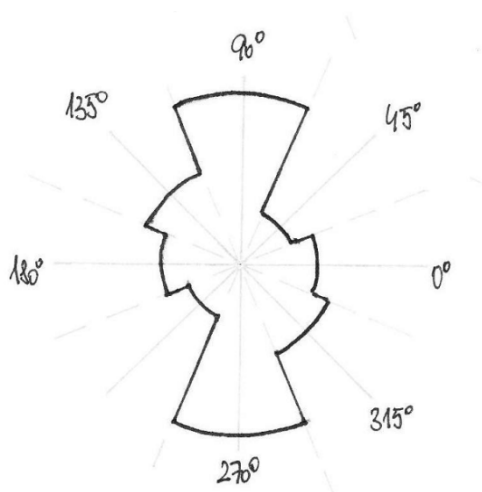
Při konstrukci směrové růžice je nutné sestavit základní síť úhlů. Pro přesnější vykreslení směrové růžice se tato základní síť doplňuje o pomocné úhly (obr.č.18) Na ramena jednotlivých úhlů se vynášejí ve stejném směru a velikosti hodnoty vzdáleností vrcholů Steinerova kompaktu jak je vidět na obr.č.19. Do kružítka dáme jednotlivé velikosti a nakreslíme půl kružnice, tak, aby začínaly na pomocném úhlu, pokračovaly přes rameno úhlu k dalšímu pomocnému úhlu. Takto opakujeme u každé hodnoty dokud nezískáme výsledný tvar směrové růžice viz obr.č.20.



Obr.č.18: Síť úhlů doplněna o pomocné úhly



Obr.č.19: Vyznačení vrcholů



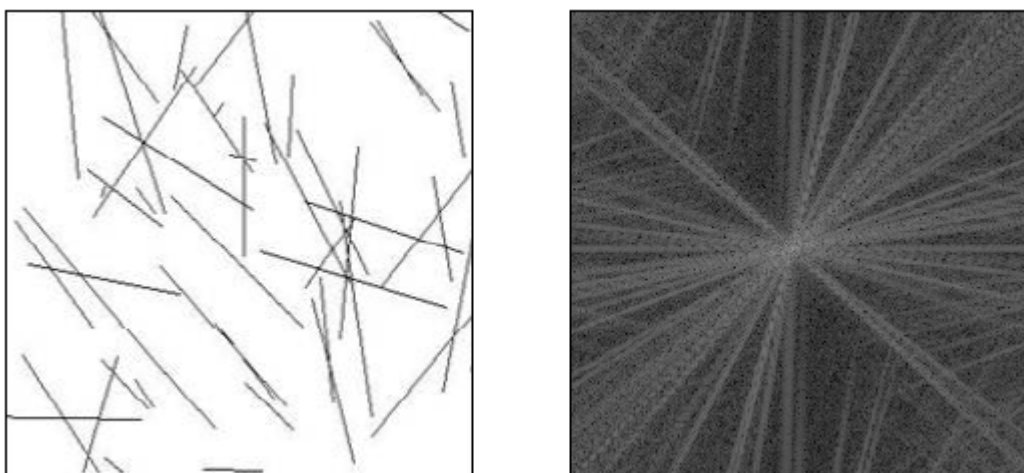
Obr.č.20: Směrová růžice

## ***Spektrální metoda určování anizotropie***

V předcházejícím odstavci jsme popsali rychlou manuální experimentální metodu popisu směrové orientace objektů pomocí směrových růžic. V následujícím textu se budeme zabývat metodou využívající dvourozměrnou Fourierovu transformaci pro spektrální metodu určování anizotropie.

### ***Dvojměrná Fourierova transformace***

Fourierovo spektrum slouží k popisu směrovosti periodicky se opakujících nebo náhodných vzorů v monochromatických obrazech textury. Dvojměrná Fourierova transformace vyhodnocuje povrch obrazu na základě frekvenčních komponent. Ve frekvenčním spektru se pak jednotlivé anomálie obrazu projeví vysokou koncentrací energie frekvenčních komponent. Fourierova transformace závisí na rotaci originálního obrazu, kde se frekvenční rovina pootočí vždy o stejný úhel. Transformace horizontálního směru se jeví jako vertikální směr v obraze spektra. Výkonové spektrum má vysoké rozlišení ve stupnici šedi, kde vysoké hodnoty frekvenčních komponent reprezentují světlá místa, jak je vidět na obr.č.21. Obraz je oproti rozložení objektu v originálním obraze o 90°.[23]



Obr.č. 21: Obraz textury a jeho výkonové spektrum

## ***Odhad pomocí polárního diagramu***

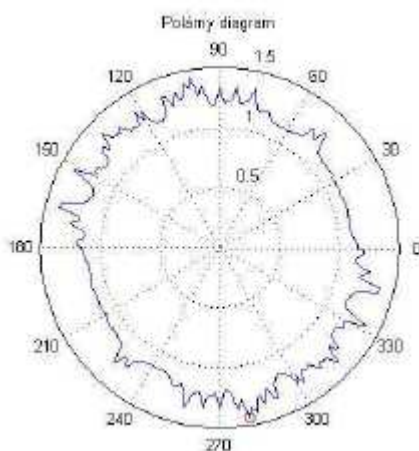
Jak bylo zmíněno v předcházející textu je možné využít vlastnosti Fourierové transformace pro odhad anizotropie vláknenných systému. Jako výstupní grafickou metodou je možné využít polárního diagramu, kde se zobrazuje směrová růžice.

Pro popis této metody využijeme matici o velikosti  $m \times n$ . Vstupní obraz je převeden do stupňů šedi výkonového spektra. Suma frekvenčních komponent  $S_\alpha$  je dána vztahem

$$S_\alpha = \frac{\sum_{i=1}^{(m+1)/2} |F(u, v)|_i}{|F(0,0)|}, \quad (2.5)$$

kde, úhel  $\alpha$  svírá úhel mezi směrovým vektorem a osou  $u$ ,  $|F(v, u)|$  je frekvenční komponenta směrového vektoru.

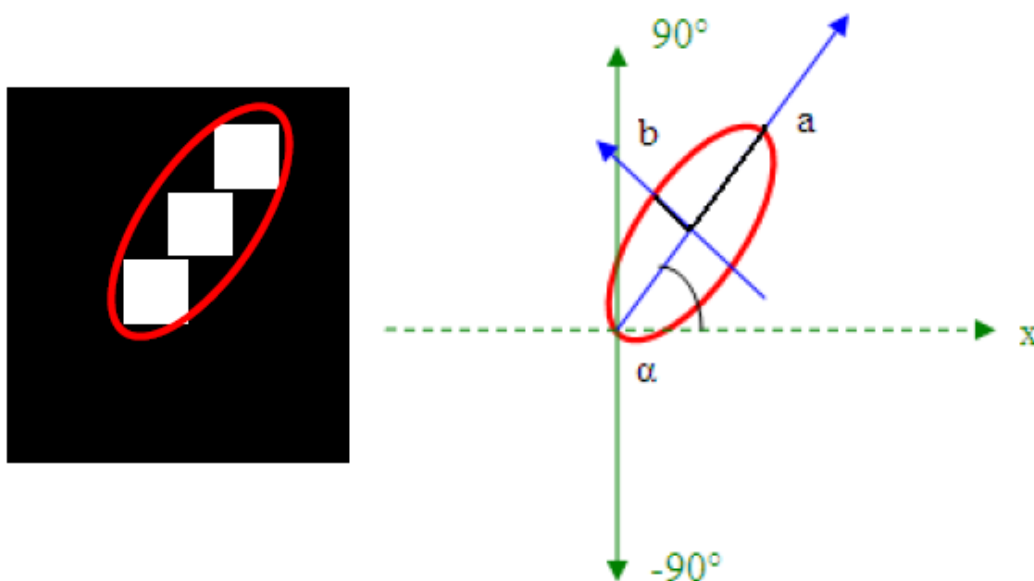
Pro vyhodnocení metody nám postačí sčítat frekvenční komponenty v rozmezí úhlu  $(0, \pi/2)$ , protože spektrum je symetrické podle počátku. Pro odhad směrové růžice se hodnoty  $S_\alpha$  vynášejí do polárního diagramu. Červený bod v diagramu signalizuje maximum v daném směru a také převažující směr v celém objektu. Výhodou této metody je její rychlé grafické zpracování, kde získáme představu o směrovém uspořádání. Další výhodou je možnost sledovat daný objekt po úhlech v rozmezí jednoho stupně. Na obrázku č.22 je vidět polární diagram odpovídající vláknenné struktuře. [23]



Obr.č.22: Polární diagram

## Odhad metodou elipsy

Jedná se o modifikovanou metodu určování směrové orientace také pomocí 2D DFT. Principem této metody je nejprve převést obraz na binární pomocí funkce prahování a pak vyhodnotit světlá místa jako rozhraní, které nás bude zajímat. V binárním obraze je pak možné vyhodnocovat různé tvarové charakteristiky a vlastnosti. Za účelem vyhodnocení směrové orientace nám poslouží poměr hlavní vedlejší poloosy elipsy, kterou si v každém z vybraných pixelů můžeme představit (obr.č.23) [23]



Obr.č.23: Znázornění hlavní a vedlejší poloosy při určování směrové orientace

Poměr hlavní a vedlejší poloosy budeme nazývat :

$$Ratio = \frac{a}{b} . \quad (2.6)$$

Kde  $a$  je hlavní poloosa elipsy,  $b$  je vedlejší poloosa elipsy

Čím více se hodnota Ratio blíží hodnotě  $= 1$ , tím více se objekt zájmu přibližuje kruhovému tvaru a směr orientace je nepreferovaný. Hodnota Ratio se vždy před vyhodnocením zadává subjektivně na základě odhadu. Pole, které tuto hodnotu nesplňuje, se

do celkového hodnocení nepočítá, protože podle parametrů nemá preferovaný směr. V této práci jsme vyhodnotili touto metodou 30 snímků a hodnota poměru hlavní a vedlejší poloosy elipsy Ratio byla 1/5. [23]

## 2.5.5 Obrazová analýza a stereologie

Obrazovou analýzou se rozumí obecně popsané postupy a operace prováděné nad obrazem, kdy vstupem jsou vlastní obrazová data a výstupem je buď jejich modifikace nebo popis jeho vlastností. Většina metod vnímá obraz jako dvojrozměrná data, přičemž vyhodnocení probíhá na digitálním signálu. Problémům, kterými se touto metodou můžeme zabývat je velké množství, ať už mluvíme o rozlišení, rozsahu, šířku pásma a bitovou hloubku, filtraci, Fourierovu transformaci, detekci hran, prahování a redukci šumu, úpravy barev, sesazování více obrázků a logické operace mezi nimi. Kromě statických obrázků je možné zaznamenávat a zkoumat série obrázků pořízené v čase (např. time – lapse techniky). Při zpracování obrazu je často důležité nejprve odlišit oblasti zkoumané od definovaného pozadí. Takto naprahovaný obraz je možné binarizovat a dále zpracovávat jako obraz binární, tedy takový digitální obraz, jehož každý pixel může nabývat právě dvou možných hodnot.

Výhodou obrazové analýzy je využití postupů k úpravě a vyhodnocení mikrofotografií a tyto kroky lze snadno automatizovat do rychlých procedur. Tyto nástroje jsou velmi efektivní při zpracování velkého množství preparátů spíše jednotného vzhledu a kontrastu s ne příliš častými defekty. Sofistikované programy dokáží spolu s uživatelem segmentovat obrazy a určit tak, které části jsou z hlediska výzkumu chtěné a které hrají pro daný problém úlohu pozadí.

V reálných podmínkách se ovšem často setkáváme s preparáty nestejnoměrné barvitelnosti a jiné defekty, které nemusí vždy souviset s nekvalitním laboratorním zpracováním, ale mohou být ovlivněny okolnosti odběru vzorku, které dost často není možné ovlivnit. V současnosti mají stereologické postupy spíše podobu interaktivních postupů, při níž uživatel sám rozhoduje na základě svých zkušeností o vhodnosti interakce vyhodnocovaného objektu s testovacím systémem. Tímto způsobem vyhodnocování snižujeme potenciaální zdroje chyb v měření, neboť pro každou situaci se lze rozhodnout pouze ano nebo ne. Je logické, že automatizace těchto postupů je pak velmi omezená. [22]



### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část zahrnuje samotné experimenty a úvodem také teoretické seznámení s měřicími přístroji a přípravou vzorků. Příprava nanovlákných vrstev spočívá ve vhodném výběru polymeru, jeho koncentraci v roztoku a metodě jeho přípravy.

#### 3.1 Příprava vzorků

V experimentální části byl pro výrobu nanovlákných vrstev použit polyvinylalkohol (PVA). Vzhledem k tomu, že vinylalkohol je sloučenina nestálá, připravuje se polyvinylalkohol hydrolýzou polyvinylacetátu (PVAc). Jedná se o polymeranalogickou reakci. V závislosti na zvolených podmínkách je možné provést tuto hydrolýzu částečnou nebo úplnou. U částečné hydrolýzy zůstává v makromolekule určité množství acetátových skupin. Polyvinylalkohol je bílý krystalický prášek. Podle stupně jeho krystalinity je více či méně rozpustný v polárních rozpouštědlech. Používá se jako tzv. ochranný koloid. Funguje jako stabilizátor disperzí v lepidlech a šlichtách. Je vláknotvorný a vlákna z něj vyrobená jsou pružná a odolná (chirurgické nitě, síť, lana). [24]

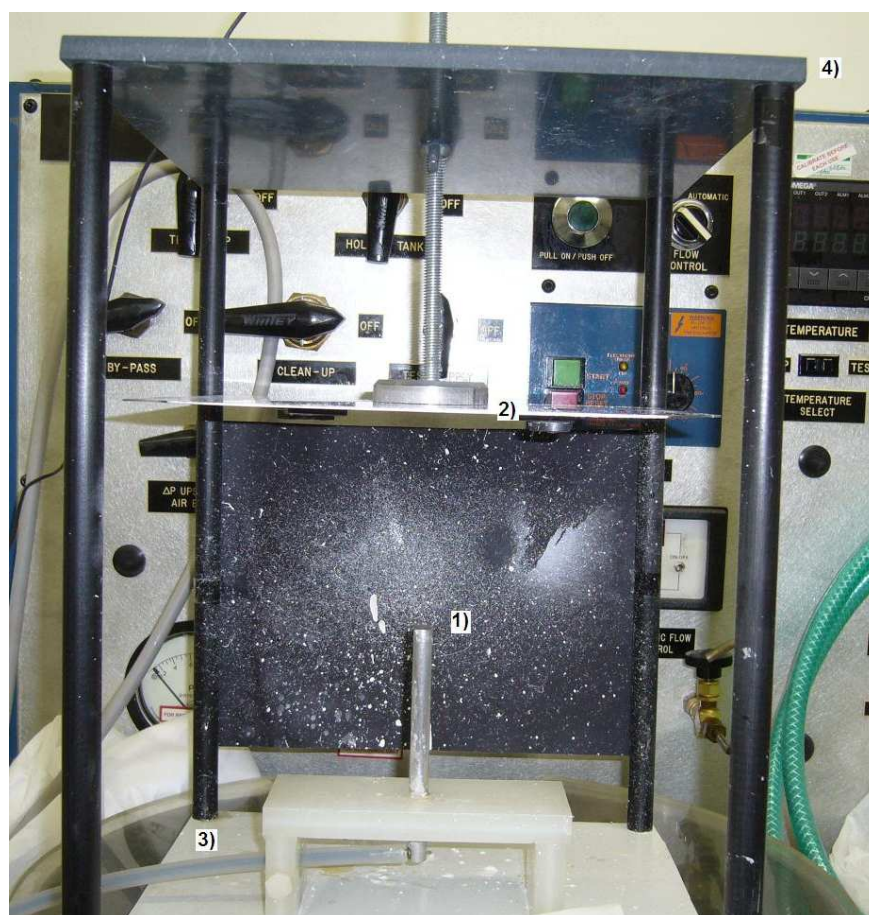
##### 3.1.1 Výroba nanovlákných vrstev elektrostatickým zvlákňováním.

Pro výrobu nanovlákných vrstev se nejprve připravil roztok PVA o 10% koncentraci, ze které se postupně elektrostatickým zvlákňováním z tyčky vytvořily nanovlákné vrstvy. Vrstvy se tvořily při konstantní vzdálenosti mezi elektrodami 10cm a napětím 25kV. Proměnná v tomto případě byla doba zvlákňování, která se uskutečnila v intervalech 3s, 5s, 10s, 15s, 20s, 25s.

##### 3.1.2 Zvlákňování z tyčky

Zvlákňování z tyčky probíhalo v laboratořích NT na aparatuře sestavené s jednoho stojanu, ke kterému byl připevněn uzemněný kolektor, a držáku s kovovou válcovou tyčkou. Na uzemněném kolektoru byl zespoda magnety přichycen černý papír, na kterém se tvořila vlákná vrstva (obrázek č.24). Držák s kolmo vsazenou kovovou tyčkou byl umístěn pod

kolektor ve vzdálenosti 10 cm. Na její spodní konec byl přiváděn proud s napětím 25kV ze záporného zdroje, na její horní konec se nanášel zvlákňovaný roztok v množství jedné kapky. Ovládání přívodu napětí bylo umístěno mimo tuto aparaturu. Bylo nutné vždy po skončení zvlákňovacího procesu odvést zbytkový proud z tyčky i kolektoru uzemňovacím drátem. Na podkladovém papíru tímto způsobem vznikalo 6 náhodně orientovaných vrstev v časových intervalech 3s, 5s, 10s, 15s, 20s, 25s.



Obr.č.24: Aparatura zvlákňování z tyčky: 1) zvlákňovací tyčová elektroda 2) kolektor 3) kabel vysokého napětí 4) stojan zvlákňovacího zařízení

### 3.1.3 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

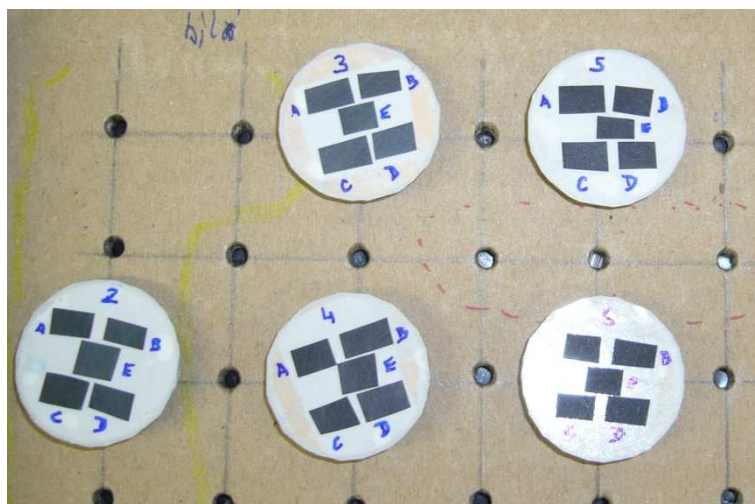
Metodou elektrostatického zvlákňování v různých časových intervalech se získalo 6 vzorků vlákných vrstev nanesených na černém podkladovém papíru. V místě nad

kolektorem se vrstva nanovláken tvořila nejdříve a byla nejhusčí. Proto se kolem tohoto pomyslného středu vystříhl vzorek o tvaru čtverce o rozměrech 40 x 40 mm a z každého čtverce vystříhl samostatný vzorek z pravého horní a levého horního rohu, z pravého spodního a levého spodního rohu a ze středu. Tímto způsobem se připravilo 30 podvzorků, které byly podrobeny dalšímu měření. V tabulce č.3 je přehled snímků z každého místa, který byl pro další měření vybrán. Je důležité upozornit, že pro každý podvzorek se vytvořilo více snímků a z nich se provedl výběr.

Čas zvlákňování	levý horní	pravý horní	levý spodní	pravý spodní	střed
3s	6A0008	6B0001	6C0008	6D0006	6E0008
5s	5A0012	5B0007	5C0009	5D0008	5E0008
10s	4A0009	4B0010	4C0009	4D0009	4E0010
15s	3A0014	3B0009	3C0005	3D0008	3E0001
20s	2A0005	2B0011	2C0007	2D0002	2E0008
25s	1A0010	1B0008	1C0001	1D0009	1E0004

Tabulka č.3: Přehled snímků z každého časového intervalu

Pro elektronovou mikroskopii se jednotlivé vzorky nalepily na terčík, aby se mohly vložit do elektronového mikroskopu (obrázek č.25). Bylo nutné zachovat stejný směr jako na původním vzorku a nijak je na terčíku neotáčet. Jinak by hodnocení anizotropie nebylo průkazné. Následovalo pozlacení terčíků pro lepší rozlišovací schopnost elektronového mikroskopu.



Obr.č.25: Vzorky připravené na pro elektronovou mikroskopii

## **3.2 Měřicí zařízení**

V následujících dvou kapitolách jsou popsány zařízení, které byly pro měření použity. Jedná se o elektronovou mikroskopii, díky které jsme získali snímky potřebné pro vyhodnocení vlákných struktur obrazovou analýzou. Obrazová analýza se provedla pomocí dvou programů NIS – ELEMENTS a ELLIPSE.

### **3.2.1 Elektronová mikroskopie**

Obecně má elektronová mikroskopie dvě hlavní výhody oproti optické. Vysoké rozlišení a schopnost velkého zvětšení. Na rozdíl od optické mikroskopie jsou fotony nahrazeny elektrony a optické čočky elektromagnetickými čočkami, které vytváří vhodně formující elektromagnetické pole. V elektronové mikroskopii se využívá hlavně toho, že vlnové délky urychlených elektronů jsou o mnoho řádů menší než vlnové délky fotonů viditelného světla. Vlnové délky viditelného světla se pohybují mezi 400 – 700 nm, zatímco vlnová délka urychleného elektronu je nepřímo závislá na použitém urychlovacím napětí. např. při napětí  $10^2$  je vlnová délka 0,123 nm. Proto je dosaženo vysokého rozlišení a umožněno zvětšování. Běžné laboratorní elektronové mikroskopy v současné době mají rozlišovací schopnost v řádu desetin nm, zatímco rozlišovací schopnost optických mikroskopů je zhruba polovinou vlnové délky použitého světla. Pokud tedy použijeme zelené světlo, které je zhruba uprostřed viditelného spektra (500 nm), je rozlišovací schopnost mikroskopu okolo 300 nm. (internet) Obecně se tato mikroskopie dělí na transmisní a skenovací. Oba tyto typy mají shodný princip pozorování, liší se přípravou vzorků a možnostmi jeho pozorování. Zdrojem elektronů je rozžhavené wolframové vlákno, elektrony jsou urychlovány polem a dopadají na vzorek. [25]

### **3.2.2 Obrazová analýza**

Obrazová analýza patří mezi nejnovější metody zjišťování parametrů struktury vlákných útvarů, její význam je i v řadě jiných oborů. Její výhodou je především snadná aplikace na připravené mikrosnímky a rychlé vyhodnocení výsledků.

### ***Program NIS - ELEMENTS***

Program NIS ELEMENT slouží k zjišťování parametrů struktury preparátu pomocí obrazové analýzy. Pomocí tohoto programu bylo provedeno měření tloušťky vláken a vyhodnoceny statistické průměry vláken. Obecně je tento program rozšířen hlavně pro jeho výhodu českého jazyka. Program má v základní verzi širokou nabídku funkcí k úpravě mikrosnímků např. kontrast a vyhlazení. U vhodně nakalibrovaného obrazu můžeme ručně měřit délky, plochy, průměry, naprahovat obraz a automaticky měřit planimetrické veličiny atd. V následujícím textu budou postupy použití tohoto programu podrobně popsány. [26]

### ***Program ELLIPSE***

Program Ellipse je dalším programem sloužícím k hodnocení obrazové analýzy. Jeho základní verze umožňuje manipulaci s obrazem, zpracování jednotlivých snímků, zvyšování jejich kvality a kvantitativní vyhodnocení. Základní verzi je možné rozšířit o moduly plug-in, které jsou již připraveny pro vyhodnocování konkrétních případů. Jedním ze speciálních plug – in modulů je LineSystem, který byl aplikován při vyhodnocení 2D délkových hustot modifikovanou Buffonovou úlohou. Podrobný postup tohoto měření bude popsán v odstavci 3.3.1. Použití tohoto programu je se souhlasem distributora a tím je prof. Mudr. Zoltán Tomori, DrSc z Ústavu experimentální fyziky v Košicích. Autorem modulu pro stereologii je pan Mudr.Pavel Karen, který souhlas s použitím také udělil. [27]

## **3.3 Experimenty**

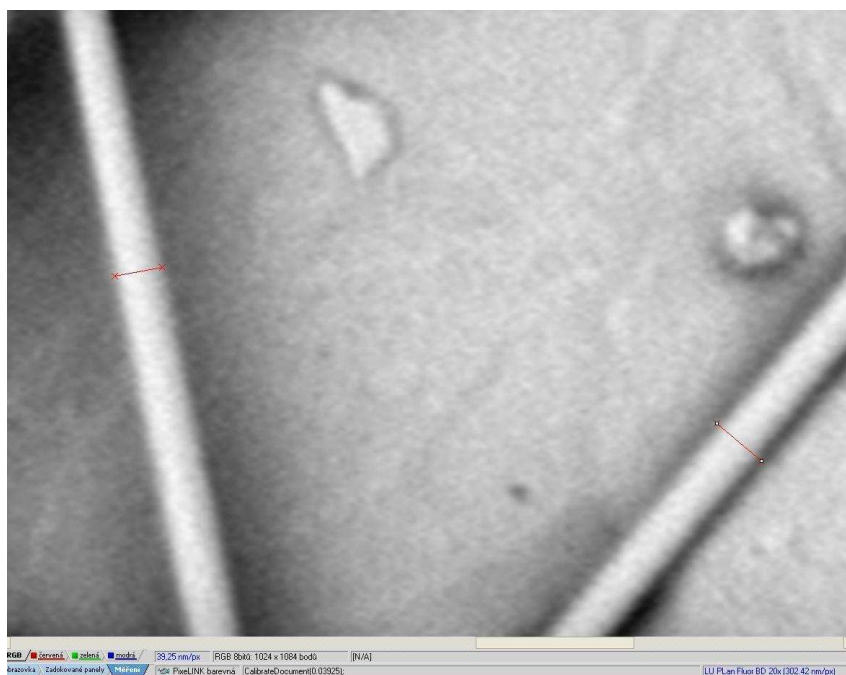
Na vybraných snímcích byla provedena měření pro zjištění některých parametrů vláknenných struktur pomocí obrazové analýzy a jejich směrové orientace. Konkrétně se obrazovou analýzou měřily tloušťky vláken, délky vláken a délkové hustoty. Dále byla provedena decelularizace tkání chrupavky hrtanu a krční arterie ovce.

### 3.3.1 Měření vybraných parametrů obrazovou metodou

Jak už bylo zmiňováno v kapitole 2.5.5, obrazová analýza skýtá ohromné výhody v hodnocení různých parametrů podle zvoleného kritéria. Měření jednotlivých snímků probíhalo na programu NIS – Elements, společnosti Laboratory Imaging a na programu Ellipse licenčně držené společností ViDiTo Košice. U všech měření byly použity tyto snímky vlákných struktur: 6A0008, 6B0001, 6C0008, 6D0006, 6E0008, 5A0012, 5B0007, 5C0009, 5D0008, 5E0008, 4A0009, 4B0010, 4C0009, 4D0009, 4E0010, 3A0014, 3B0009, 3C0005, 3D0008, 3E0001, 2A0005, 2B0011, 2C0007, 2D0002, 2E0008, 1A0010, 1B0008, 1C0001, 1D0009, 1E0004.

#### *Měření průměru vláken*

Měření průměrů vláken na jednotlivých snímcích probíhalo na programu NIS – Elements. Po spuštění programu a vybrání příslušného snímku bylo nutné provést kalibraci. Kalibrace přiřazuje snímku reálný rozměr stanovením její jednotky a většinou byla hodnota velikosti rozlišení snímku v programu již nastavena, takže stačilo použít příslušnou ikonu. V nabídce programu se dále použila ikona šipky, kterou bylo možné měřit délky tím, že křížkem označíme začátek a konec úsečky. V našem případě nám délka úsečky stanovovala okraje vlákna a tudíž jeho tloušťku. Při měření bylo důležité udržovat určitou kolmost dané úsečky vůči poloze vlákna, abychom zbytečně nevytvářeli odchylky a nezkreslovali tak výsledek. Zjištěná hodnota každého měřeného průměru vlákna byla zanesena do tabulky dat a jejím exportem jsme získali přehled těchto hodnot v excel.tabulce. Tabulka obsahuje nejen jednotlivá měření, ale i statistické hodnoty k nim vztažené jako statistický průměr, směrodatnou odchylku, minimum a maximum v jednotkách, které jsou stanoveny. Před začátkem dalšího měření bylo nutné z paměti vymazat předcházející měření, jinak by záznam dat pokračoval ve stávající statistice. Na obrázku č.26 jsou dobře vidět úsečky při měření i snaha o jejich kolmost.



Obr.č.26: Ukázka měření tloušťky vláken obrazovou analýzou.

### ***Měření délek lineárních struktur ve 2-D***

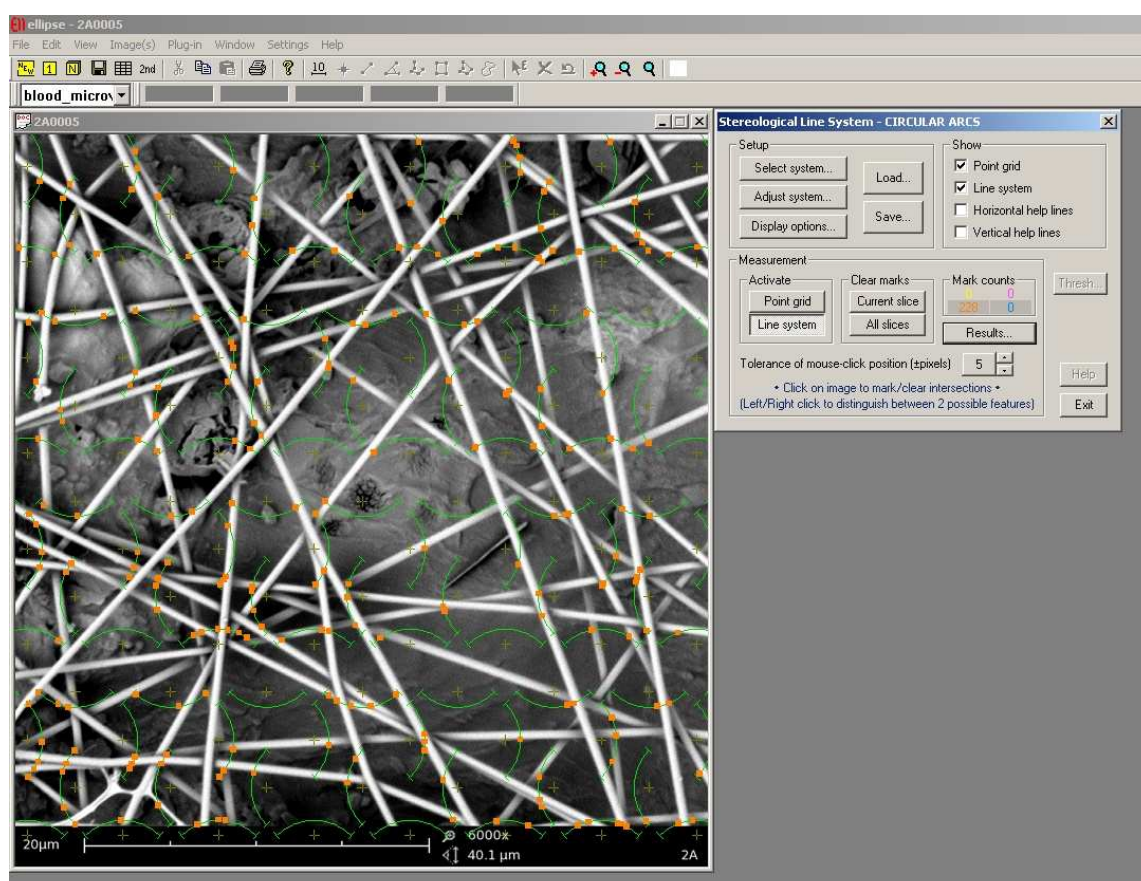
Abychom mohli objektivně říci, do jaké míry jsou stereologické metody přesné či nikoliv, je dobré u případů, které to umožňují, vyzkoušet více metod a výsledky mezi sebou porovnat. Výhodou vláknenných systému, které jsme vytvořili, je relativně vysoká linearita jednotlivých vláken. Vláknina se sice v určitých místech překrývají, ale nedochází zde k deformaci ani k tvarovým anomáliím. Vláknina jsou rovná a lze je tedy pomocí obrazové analýzy jednoduše změřit.

### ***Měření délek modifikovanou Buffonovou úlohou***

Měření touto metodou probíhalo na programu Ellipse. V rámci rozšířené nabídky tohoto programu je i speciální modul určený pro metody stereologie. Po načtení základního okna menu je nutné snímek načíst a nakalibrovat. Kalibrace probíhá v tomto případě zvolením ikony kalibrace. Program nabídne podokno, kde pomocí kurzoru naměříme délku úsečky ve spodní části obrazu a přiřadíme této hodnotě jednotky uvedené tamtéž. Tak získá snímek reálné rozměry a je možné s ním dále pracovat. Po kalibraci následuje výběr požadovaného



plug – in modulu a ten se v našem případě nachází pod ikonou Ellipse. Tato ikona obsahuje i jiné moduly a je nutné výběr dále specifikovat. Jednou z možností, kterou tato ikona nabízí, je pojem Stereology, který po odměáčknutí nabízí další možnost výběru a to LineSystems. Volbou tohoto systému už program připraví snímek pro poslední výběr a nabídne nám informační podokno, kde pomocí Select system vybereme sondu. V našem případě používáme cirkulární oblouky jakožto jednu z 2D izotropních mřížek, takže volba sondy je Circular arcs. Nyní už program sám sondu na daný snímek aplikuje a uživatel může začít s vyhodnocováním daného snímku. Čím řidší mřížku a tím pádem i méně průsečíků bude na vlákněném systému, tím více klesá přesnost odhadu. Stereologická metoda spočívá v počítání průsečíků mezi vlákny a sondou. Vlákna si pro účely měření délky představíme jako jednorozměrné linie. Při hodnocení průsečíků je nutné stanovit místa na vláknech, která budou označena, aby výsledky byly co nejpřesnější. V našem případě jsme si vybrali jejich spodní a levou stranu, jak je patrné na obrázku č.27.



Obr.č.27: Stereologické hodnocení počtu průsečíků v testovacím systému.



Veškeré údaje, které se v průběhu hodnocení zaznamenávají, jako počet průsečíků, plocha snímku, odhad celkové délky, 2D délková hustota, jsou shrnuty do souboru s názvem linesystem1\_results.txt

```

*****
*                                     *
*   STEREOLOGICAL LINE SYSTEMS - MEASUREMENT RESULTS FILE   *
*                                     *
*****
Created on 02Aug11 at 13:32:53

Task name is "unnamed_task"
-----
1st feature name is "1st_Feature"
2nd feature name is "2nd_Feature"

Image information
=====
Image/Stack dimensions are 1024x1084x1

Calibration
-----
pixel size is 0.0394477 µm
pixel area is 0.00155612 µm^2

Line system specification
=====
Line system type is CIRCULAR ARCS
-----
Total area of slice is 1727.32 µm^2
Area associated with each point (a/p) is 15.5612 µm^2
Length associated with each point (l/p) is 4.85207 µm
Number of points hitting each slice is 113
Ratio of (slice area)/(point area) is 111.002

Counts of point and line intersection marks
=====

    +---1st_Feature---+---2nd_Feature---+
slice | points | lines | points | lines |
-----+-----+-----+-----+-----+
    1 |     0 |   228 |     0 |     0 |
-----+-----+-----+-----+-----+

***** ESTIMATIONS *****
> For actual case, user should select only reasonable results
> Other specific methods can be applied using counts reported above
Rough measure of area estimation accuracy (using current point-grid parameters)
-----
Relative difference between estimated and actual total slice area [(Est-Act)*100/Act] is 1.80033%

LENGTH ESTIMATIONS in 2D (modified Buffon's method)
=====
Length densities (length per unit area of reference space) in [1/µm] and total lengths
(based on count of line intersections with feature and points hitting reference space)

Length density of '1st_Feature'
-----
If whole specimen area is the reference space, length density is 0.653204
Total length of '1st_Feature' (if applicable) is 1148.61 µm

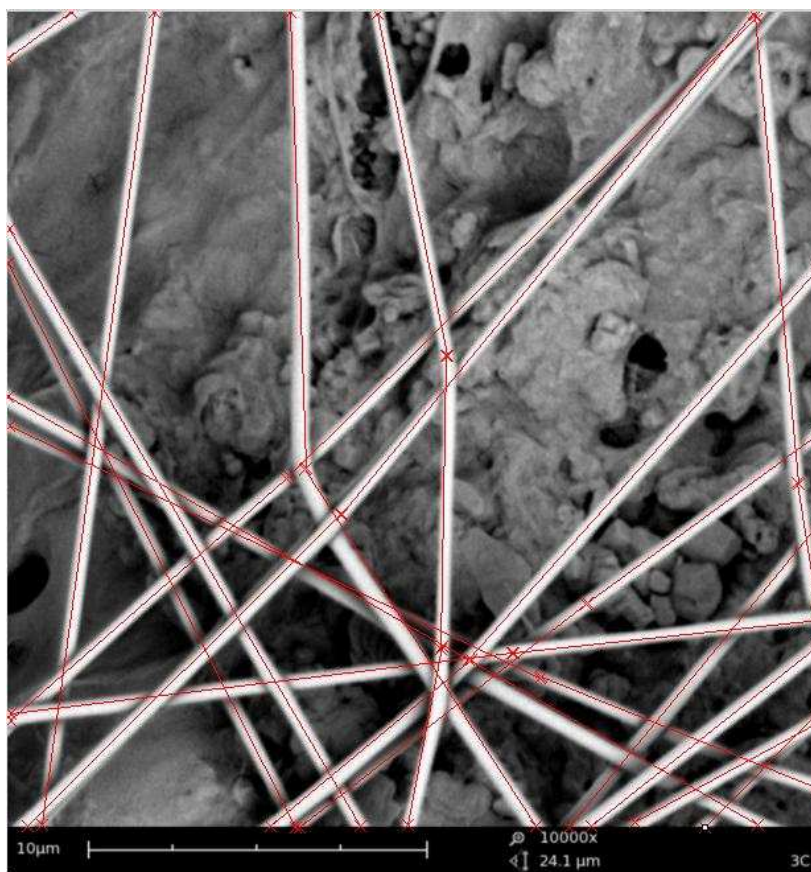
```

## ***Měření délek pomocí obrazové analýzy***

Protože je dobré být při použití „nových metod“ a priori nedůvěřivý, je možné délku jednotlivých vláken změřit pomocí obrazové analýzy a to stejným způsobem jako při měření tloušťky vláken. Délky jednotlivých vláken se zaznamenávají do tabulky stejně jako při

předchozím měření a pouhým sečtením jejich délek získáme parametr vhodný k porovnání. Na obrázku č. 28 je dobře vidět analýza jednoho ze snímků vlákenné struktury. Postup měření byl stejný jako u hodnocení tloušťky vláken v odstavci č. 3.3.1 a probíhal v programu NIS – ELEMENTS obrazovou analýzou. Pro toto měření byly vybrány následující snímky:

2A0005, 3C0005, 4B0010, 5D0008, 6E0008. Nebyly použity na měření všechny snímky, protože záměr je zhodnotit a porovnat výsledky se zvolenou stereologickou metodou. Nikoliv získat touto metodou už jednou získané hodnoty.



Obr.č.28: Měření délek obrazovou analýzou u snímku 3C0005

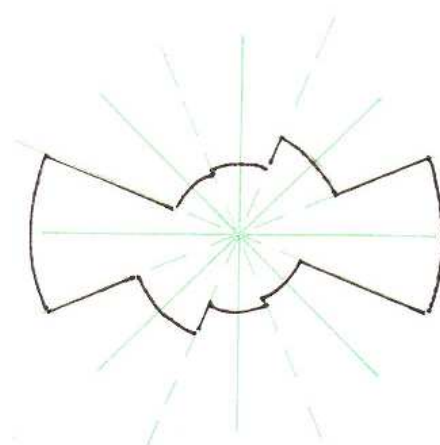
### 3.3.2 Směrová orientace vlákenných struktur

Při elektronovém zvlákňování dochází k zdánlivě chaotickému ukládání vláken na kolektor. Pokud bychom se blíže zajímali o danou strukturu, zjistíme, že vlákna mají přednostní orientaci v určitém směru. Při zjišťování směrové orientace vyrobených vlákenných struktur bylo použito několik metod. Pro názornost, jednoduchost a přesnost byla

vybrána grafická metoda sestrojením směrové růžice. Další grafické znázornění směrové orientace se vytvořilo pomocí polárního diagramu. Poslední metoda, která byla použita je modifikovaná metoda pomocí elipsy. Všechny postupy jsou popsány v odstavci č. 2.5.4 a pro všechny metody byly vybrány následující snímky : 6A0008, 6B0001, 6C0008, 6D0006, 6E0008, 5A0012, 5B0007, 5C0009, 5D0008, 5E0008, 4A0009, 4B0010, 4C0009, 4D0009, 4E0010, 3A0014, 3B0009, 3C0005, 3D0008, 3E0001, 2A0005, 2B0011, 2C0007, 2D0002, 2E0008, 1A0010, 1B0008, 1C0001, 1D0009, 1E0004. Výsledkům tohoto měření je věnována celá příloha č.2.

### ***Grafická metoda – směrové růžice***

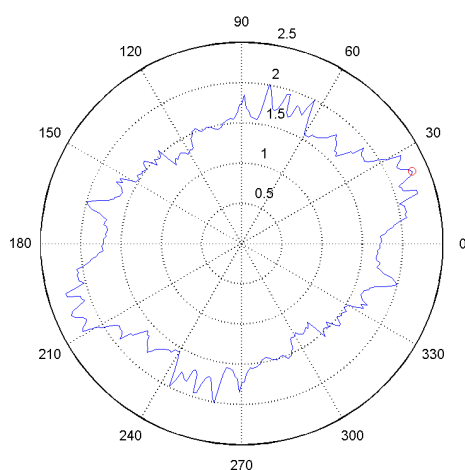
Základem této metody je vytvoření směrové růžice, která jednoduše zobrazuje směrovou orientaci zkoumaného vlákenného systém. Sítí úhlů se postupně přikládala na pět různých míst snímku (levý a pravý horní roh, levý a pravý spodní, a střed) a zjištěné průsečíky vlákenného systému se sítí úhlů se zaznamenávali do tabulky. Statistický průmět těchto hodnot se stal podkladem pro vytvoření nejdříve průsečíkové růžici vynesemím hodnot do polárního programu pootočeného o  $90^\circ$ . Z vyznačených bodů se vedly kolmice, které vytvořily mnohoúhelník zvaný Steinerův kompak. Vzdálenosti vrcholů mnohoúhelníka se už v nezměněném směru přenesly na novou síť doplněnou o pomocné úhly. Směrová růžice vznikla spojením průsečíků křivek s rameny jednotlivých úhlů. Na obr.č. 29 je znázorněna směrová růžice snímku 2B 0011:



Obr.č.29: Směrová růžice snímku 2B 0011

## ***Grafická metoda – Polární diagram***

Tato grafická metoda byla provedena v programovacím jazyce Matlab za přítomnosti pana Ing.Tunaka Phd. Metoda je založená na Fourierové transformaci, kde hodnoty frekvenčních komponent Fourierového spektra se sčítají do směrového vektoru pro každý úhel. Hodnoty se potom vynášejí do polárního diagramu jako odhadu směrové růžice a histogramu. Výhodou této metody je její rychlost, výsledky jsou k dispozici prakticky ihned po získání snímku a aplikaci algoritmu. Navíc je možné sledovat směrovou orientaci prakticky po úhlech. Červený bod v diagramu signalizuje maximum v daném směru a také převažující směr v celém objektu. Na obr.č. 30 je zobrazen polární diagram stejné vlákenné struktury jako v předchozím obrázku, kde byla zobrazena směrová růžice.

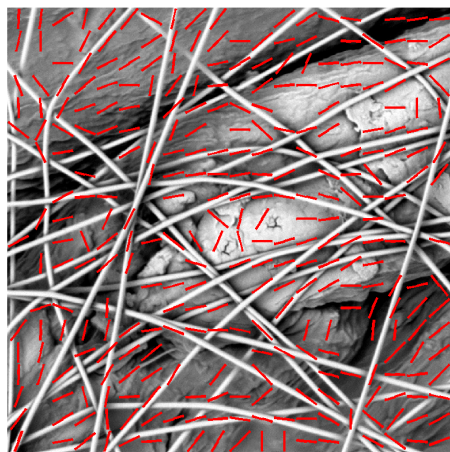


Obr.č.30: Polární diagram snímku 2B 0011

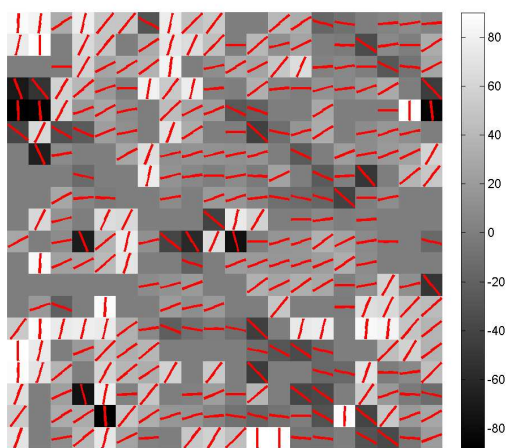
## ***Modifikovaná metoda pomocí elipsy***

Modifikovaná metoda pomocí elipsy je další metodou využívající vlastností Fourierové transformace a jeho naprahaného spektra, kde vysoké hodnoty frekvenčních komponent jako shluk bílých pixelů představují oblast zájmu. Pro tyto oblasti jsou zjištěny hodnoty hlavní a vedlejší poloosy elipsy a směr orientace, který představuje preferovaný směr vlákenného systému. Minimální hodnotu poměru mezi hlavní a vedlejší poloosou si

stanovíme před začátkem měření a program pak vyhodnotí pouze ty oblasti, které tento parametr splňují. Ostatní oblasti vyhodnotí jako pozadí a nebude je zahrnovat do celkového hodnocení. Pro všechny vyhodnocované snímky byla tato hodnota 1/5. Snímky byly rozděleny do čtvercové sítě s počtem 400 podoken s různou intenzitou šedi, kde jsou zobrazeny směry jednotlivých vektorů. Na okraji této sítě jsou k jednotlivým stupňům šedi přiřazené hodnoty úhlů. Aby byl u této metody jasný preferovaný směr, převedly se hodnoty odpovídající daným úhlům do histogramu. Pro názornost jsou směrové vektory vyznačeny i na originálním snímku. Pro lepší názornost byl použit stejný snímek jako u předcházejících metod. Na obr.č. 31 jsou aplikací algoritmu znázorněny směrové vektory v originálním snímku. Na obr.č. 32 je obraz převedl na síť podoken, kde je v každém místě znázorněn daný směr. Je zde možné si všimnout podoken, kde není znázorněn žádný směr. V tomto místě není splněna podmínka minimální hodnoty poměru hlavní a vedlejší poloosy a podokno bylo vyhodnoceno jako pozadí. Na obr.č.33 je histogram hodnot odpovídající danému úhlu. Je zde nejlépe vidět preferovaný směr dané struktury i možnost porovnání s ostatními metodami.

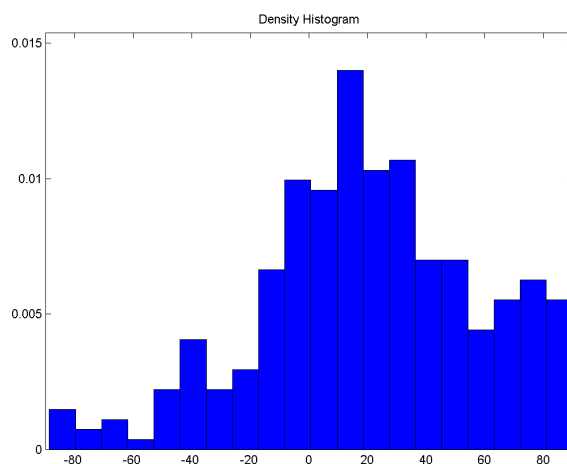


Obr.č.31:Směrové vektory na snímku 2B 0011



Obr.č.32:Směry v jednotlivých podoknech





Obr.č.33: Grafické znázornění směrové orientace

### 3.3.3 Příprava vzorků decelularizované tkáně

Cílem tohoto experimentu je odstranit chemickou decelularizací buňky z tkání a získat tím ECM, která bude sloužit jako tkáňový nosič.

Pro přípravu vzorků decelularizované tkáně byly použity histologické preparáty chrupavky hrtanu a krční tepny ovce (obr.č.34). Stáří jedince bylo 8 měsíců, pohlaví samec, křížení merino a safolk. Chrupavka se nařezala na 3 části cca 1, 5 cm silné, které se očistily ve fyziologické roztoku. Tepna se rozdělila na 2 části cca 2,5 cm dlouhé. U všech preparátů se opatrně odstranil z povrchu přebytečný tuk. Takto byly vzorky připravené pro vložení do decelularizačního roztoku a roztoku formaldehydu. Vždy po jednom vzorku chrupavky a tepny se odebraly, vložily se do 10% roztoku formaldehydu a sloužily k porovnání výsledků a posouzení vhodnosti této metody. Vzorky byly uchovány v chladničce značky Liebherr při teplotě 6 °C.



Obr.č.34: Snímek tkání chrupavky a aorty před decelularizací

### ***Příprava decelularizačního roztoku***

Pro přípravu 100 ml decelularizačního roztoku byly použity 0,5% Triton X – 100, 0,1% SDS (dodavatel : SIGMA), 0,1% EDTA (dodavatel : SIGMA), 0,02%  $\text{NaN}_3$  v 50 mM Tris pufru (dodavatel : AppliChem, pH 7,5). V laboratoři byl k dispozici roztok 1M pufru, takže odebráním 5ml do kádinky a doplněním destilovanou vodou do objemu 100 mm získáme požadovanou koncentraci. Do pufru se postupně přidávalo 0,5 ml Tritonu X – 100, 0,1 g SDS, 0,1g EDTA a 0,02 g  $\text{NaN}_3$ . Po důkladném promíchání na magnetické míchačce byl roztok připraven k použití.

Dvě tkáně chrupavky a jedna tkáň tepny se po očištění ve fyziologickém roztoku vložily do zkumavek o objemu 50 ml a zalily decelularizačním roztokem v množství cca 30ml. Zkumavky se poté uložily na 3 dny do třepačky Shaking Incubator NB 205, kde byla konstantní teplota 20 °C a konstantní počet otáček 125/min.

Po třech dnech se zkumavky vyndaly, připravil se nový decelularizační roztok ve stejném složení a po důkladném opláchnutí preparátů ve fyziologickém roztoku se znovu vložily do zkumavek a zalily roztokem. Takto se znovu uložily do třepačky se stejnou

dosavadní teplotou a otáčkami. Na obr. je vidět decelularizovaná tkáň chrupavky po prvních třech dnech.



Obr.č.36: Decelularizovaná tkáň chrupavky po prvních třech dnech

V decelularizačním roztoku byly vzorky uloženy po dobu 3 dnů, poté se tkáň promyly ve fyziologickém roztoku po dobu cca 10 min v pěti cyklech a připravil se roztok, ve kterém se rozpustilo 0,02 g  $\text{NaN}_3$  ve 100 ml vody. Tkáň se do roztoku vložily a nechaly se cca 3 – 4 dny při konstantní teplotě 20 °C.

Tímto krokem byla chemická decelularizace ukončena a je nutné připravit vzorky na elektronovou mikroskopii.

### ***Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii***

Příprava vzorků na elektronovou mikroskopii spočívá nejprve ve vysušení. To se provádí v roztoku acetonu o různých koncentracích. K dispozici jsme v laboratořích měli 100% aceton, který jsme vhodnými poměry ředily na roztoky o koncentracích 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% (obr.č. 37) Postupně jsme do jednotlivých koncentrací vkládali tkáň a nechali působit po dobu cca 10 min, přičemž jsme začínali od nejslabších roztoků. Po dokončení jsme vše uložily do 10% formaldehydu a nechali v chladničce o teplotě 6 °C.



Další den jsme celý postup opakovali a s tím rozdílem, že do jednotlivých kádínek s odlišnou koncentrací se vkládal kousek chloridu vápenatého. Chlorid vápenatý se řadí mezi hygroskopické látky, velmi silně poutá vzdušnou vlhkost ze vzduchu za vzniku hydrátu. Dobře se rozpouští ve vodě a částečně v acetonu. Bezvodý chlorid vápenatý se používá jako sušící činidlo a v našem případě byl pro to použit. [28]



Obr.č.37: Vysoušení tkání v různých koncentracích acetonu

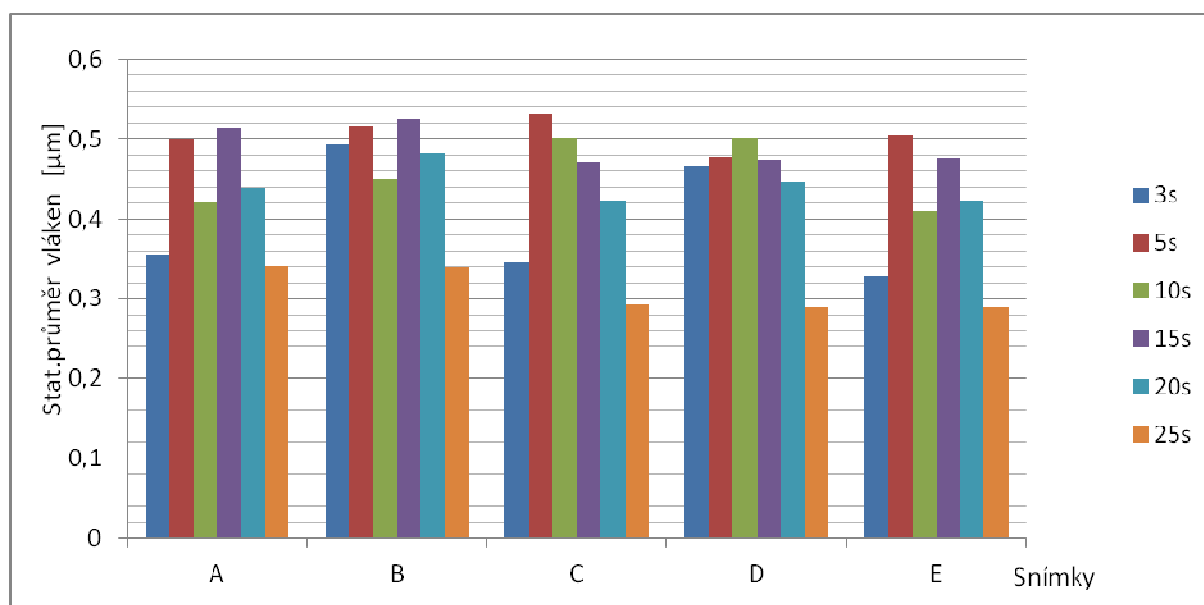
Po vysoušení jednotlivých preparátů bylo nutné zvolit vhodné medium, do kterého vzorky umístíme tak, abychom mohli vytvořit dostatečně tenké řezy vhodné na elektronovou mikroskopii. V našem případě jsme použili čistý vosk, který jsme po roztavení nalili do pouzdra předem daných rozměrů odpovídajících otvoru pro uchycení preparátu při tvorbě řezů. Preparáty jsme po vysoušení opatrně nastříhali a odebrali vzorky tak, abychom při řezech získali pohledy v horizontálním směru i vertikálním. Další možností jak stabilizovat vzorky pro tvorbu jejich řezů jsou, kromě parafínu, měkké a tvrdé pryskyřice. Tvrdé pryskyřice se po vytvrnutí musí brousit a jejich řezy tudíž nejsou dostatečně hladké. Měkké pryskyřice by byly pro naše účely také vhodné a pokud se parafín jako medium neosvědčí, byla by to další alternativa.

### 3.4 Výsledky

Tato diplomová práce popisuje stereologické metody aplikované na připravených vláknenných strukturách. V teoretické části je uveden postup měření těchto metod pomocí obrazové analýzy, experimentální grafická metoda určování anizotropie a postupy decelularizace tkání. Cílem experimentální části bylo jednak vyrobení nanovláknenných vrstev z roztoku polyvinylalkoholu, připravení 2D snímků pomocí elektronového mikroskopu a následně vyšetření obrazovou analýzou tloušťka vláken a měření délek a délkový hustot. Chemická decelularizace byla provedena na chrupavce hrtanu a arterii ovce. Cílem tohoto experimentu bylo nejen získání decelularizované tkáně, ale i použití vhodného fixačního media, které by umožnilo vytvořit řezy a získat snímky na elektronovém mikroskopu. Provedlo se zalití vzorků do vosku, ale nezískaly se řezy, protože vosk nebyl dostatečně pevný, aby nedocházelo k lomům a k destabilizaci vzorků pro řezy. V závislosti na dosavadních možnostech katedry netkaných textilií a s ohledem na skutečnost, že katedra tento experiment provedla poprvé, se nepovedlo vzorky fixovat v jiném mediu a řezy provést. Pro hodnocení celého experimentu bylo dosaženo pouze snímků optickou mikroskopií, která ovšem nemá takové rozlišovací schopnosti, aby se snímky mohly vyhodnotit stereologickými metodami a porovnat s vláknennými strukturami získané elektrostatickým zvlákňováním.

#### 3.4.1 Vyhodnocení měření průměrů vláken

V experimentální části kapitole 3.3.1 je popsán postup měření této charakteristiky. Všechny zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách č. v příloze č.1. Grafické znázornění je ukázkou porovnání hodnot nejen v časových intervalech zvlákňování 3s, 5s, 10s, 15s, 20s, 25s, ale i v místech odběru. Graf č.1 ukazuje hodnoty statických průměru všech naměřených hodnot v daném časovém intervalu a v jednotlivých místech odběru. Je z něho dobře patrné, že se hodnoty v rámci celého vzorky příliš neliší a není tomu jinak ani při porovnání hodnot v rámci časových intervalů, kde se minimum pohybuje v hodnotách kolem 0,3  $\mu\text{m}$  a maximum 0,5  $\mu\text{m}$ .



Graf č.1 Statistické průměry hodnot naměřených v časových intervalech.(A,B) jsou odběry a z levého a pravého horního rohu, (C,B) jsou odběry z levého a pravého spodního rohu, (E) je odběr ze středu.

### 3.4.2 Vyhodnocení anizotropie

Při měření anizotropie byla jednak použita experimentální grafická metoda Směrové růžice a dále spektrální metody pomocí polárního diagramu a modifikované metody pomocí elipsy. Všechny metody měly vést ke stanovení směrové orientace vláknenných struktur. Výsledná zobrazení z jednotlivých metod jsou uvedena v příloze č.2, tak, aby bylo možné jejich porovnání. Porovnáním jednotlivých metod v konkrétním snímku se zjistilo, že směrová růžice pomocí Steinerova kompaktu je citlivá na malé změny vstupních dat. Naopak velice přesné grafické znázornění poskytuje tato metoda u snímků, kde nám pozadí tvoří 90% celého snímku. Spektrální metody totiž dost část vyhodnocují toto pozadí jako součást vláknenného systému a výsledky jsou nepřesné. Grafická metoda pomocí polárního diagramu se ukázala jako podrobnější v znázornění směrové orientace jednotlivých úhlů. Modifikovaná metoda pomocí elipsy dává ucelený soubor informací o dané struktuře. Pomocí histogramu, kde jsou uvedeny součty směrových vektorů odpovídající daným úhlům, se velice snadno zjistí preferovaný směr.

Po vyhodnocení bylo zjištěno, že všechny metody stanovily stejný nebo podobný směr orientace vláken. Jen v závislosti na dané metodě byly výsledky konkrétnější. U všech vláknenných struktur, které byly připraveny, se projevila anizotropie.

### **3.4.3 Vyhodnocení měření délek lineárních struktur**

Postup měření metody modifikovanou Buffonovou úlohou je podrobně popsán v kapitole 3.3.1. Pomocí této metody jsme k jednotlivým snímkům získali odhady délek vláken a délkové hustoty. Principem hodnocení struktury touto stereogickou metodou je aplikace testovacího systému na vláknenný systém a zaznamenání počtu průsečíku mezi vlákny a testovací sondou. V tabulce č.5 je přehled všech měřených snímků, počty průsečíků v daných strukturách, plochy hodnocených snímků, odhady celkových délek vláken a délkové hustoty. V tabulce jsou u některých snímků uvedeny hodnoty celkových délek vláken získané jinou metodou. Jedná se o metodu měření vláken pomocí obrazové analýzy, která je popsána v odstavci 3.3.1 a která spočívá v přesném měření jednotlivých vláken pomocí úseček. Snímky s označením 1 jsou struktury zvlákňované v intervalu 25s a jejich délkové hustoty jsou největší. Ani na jednom z těchto snímků není provedeno měření délek jinou metodou, protože tyto snímky ještě neměly vrstvu zlata při zpracování elektronovým mikroskopem a snímky nejsou dostatečně ostré. Snímky s označením 2 byly zvlákňovány v časovém intervalu 20s. Měření délek vláken jinou metodou proběhlo u snímku 2A 0005 a hodnoty se téměř nelišily. Snímky s označením 3, 4, 5, 6 odpovídaly časovým intervalům zvlákňování 15s, 10s, 5s, 3s. V každé skupině bylo také provedeno jedno kontrolní měření délek vláken jinou metodou a rozdíly v hodnotách byly velmi malé.

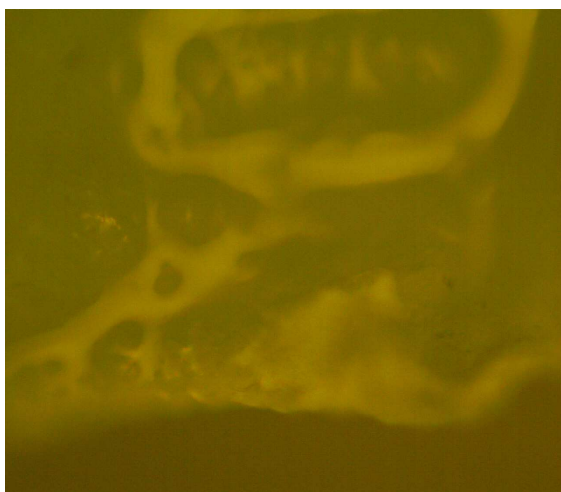
Dá se tedy říci, že odhady délek pomocí stereologie byly poměrně přesné a jejich uplatnění je široké. Uvážíme-li, že hodnocené struktury nejsou vždy tam pravidelné, aby bylo možné použít jiných metod, získáváme metodou modifikované Buffonovy úlohy plnohodnotná data pro další výzkum.

Tab.č.5: Naměřené hodnoty délek lineárních struktur a délkových hustot.

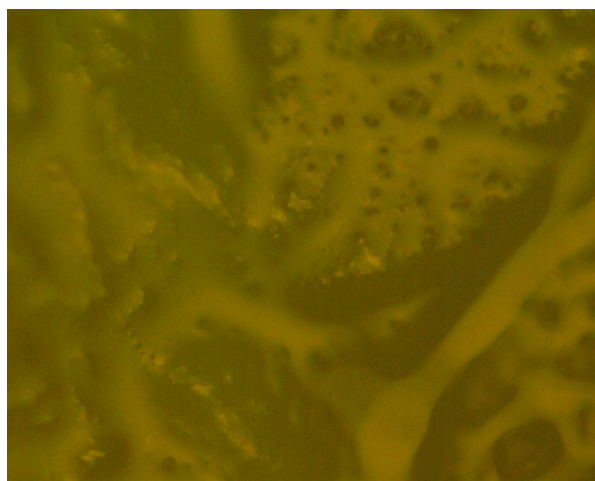
Označení snímku	počet průsečíků	Plocha snímku [ $\mu\text{m}^2$ ]	Odhad celkové délky vláken [ $\mu\text{m}$ ]	2D délková hustota [ $\mu\text{m}^{-1}$ ]
1A 0010	242	965,895	911.655	0.927153
1B 0008	227	965.895	855.147	0.869685
1C 0001	246	965.895	926.723	0.942478
1D 0009	297	1275.51	1285.73	0.990181
1E 0004	311	1707.06	1557.52	0.896266
2A 0005	228	1727.32	1148.61	0.653204
<b>2A 0005</b>	<b>použita jiná metoda</b>		<b>1129.12</b>	
2B 0011	200	1713.77	1003.59	0.575247
2C 0007	142	1713.77	712.55	0.408425
2D 0002	179	1713.77	898.214	0.514846
2E 0008	167	614.542	501.813	0.802124
3A 0014	193	1713.77	968.466	0.555113
3B 0009	186	1233.35	791.784	0.630624
3C 0005	127	608.798	379.831	0.612869
<b>3C 0005</b>	<b>použita jiná metoda</b>		<b>345.35</b>	
3D 0008	82	620.367	247.564	0.392004
3E 0001	106	614.542	318.516	0.509133
4A 0009	141	1457.17	652.416	0.439809
4B 0010	131	760.681	437.948	0.56555
<b>4B 0010</b>	<b>použita jiná metoda</b>		<b>434.832</b>	
4C 0009	72	1707.06	360.585	0.207496
4D 0009	81	1457.17	374.792	0.252656
4E 0010	92	954.598	344.547	0.354551
5A 0012	79	1446.67	364.219	0.247311
5B 0007	70	971.619	264.482	0.267394
5C 0009	167	2458.17	1003.63	0.401062
5D 0008	93	2458.17	558.906	0.223346
<b>5D 0008</b>	<b>použita jiná metoda</b>		<b>615.446</b>	
5E 0008	61	2458.17	366.594	0.146496
6A 0008	57	2435.19	340.951	0.137534
6B 0001	172	61322.9	5162.86	0.082702
6C 0008	34	2458.17	204.331	0.081653
6D 0006	29	2469.78	174.694	0.069481
6E 0008	27	2446.64	161.882	0.064995
<b>6E 0008</b>	<b>použita jiná metoda</b>		<b>154.372</b>	

### 3.4.4 Vyhodnocení decelularizovaných tkání

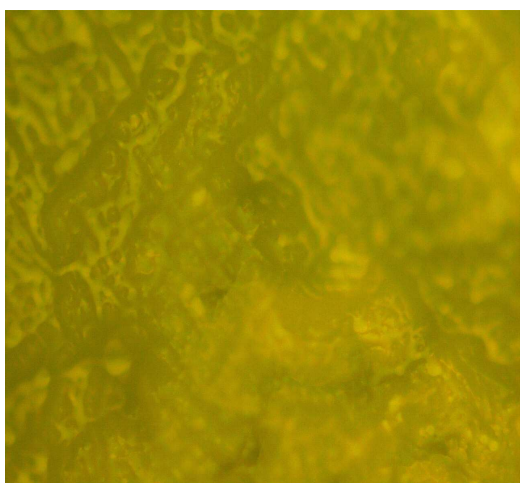
Jak už bylo podrobně popsáno v experimentální části v odstavci č. 3.3.3 chemickou decelularizací se získaly vzorky ECM chrupavky hrtanu a krční arterie ovce. Po dokončení procesu decelularizace následoval proces vysoušení vzorků, aby bylo možné vzorky fixovat a získat tak řezy potřebné pro elektronovou mikroskopii. Zvoleným fixačním mediem byl vosk, který bohužel neměl takové mechanické vlastnosti potřebné ke stabilizaci vzorků, aby se řezy mohly připravit. Problém byl nejen s tím, že docházelo k lomům v místech uložení preparátu, ale vosk byl celkově měkký, takže při řezu by stejně došlo k posunu preparátu a výsledek by nebyl vyhovující. Protože se z časových důvodů nepodařilo připravit další vzorky v jiném fixačním mediu, kde by se provedla analýza decelularizovaných tkání, nejsou k dispozici data potřebná pro vyhodnocení úspěšnosti chemické decelularizace. Další možná fixační media mohly být měkké a tvrdé pryskyřice. U tvrdých pryskyřic je po vytvrdnutí nutné brusným kotoučem připravit řezy. Ty zanechají na ploše řezu stopy, které nejsou pro analýzu vzorku dobré. Měkké pryskyřice by byly pro biologické preparáty vhodné, jen nejsou nyní na katedře dostupné. Další alternativou bylo navštívit specializované pracoviště, na kterém by řezy připravili. Vzorky se zavezly do Ústavu molekulární genetiky v Praze, kde by řezy teoreticky připravily. S ohledem na to, že postup by byl i tak časově náročný a navíc není pro biologické preparáty určené pro další výzkum vhodné uchovávání v roztoku formaldehydu, se nakonec řezy nevytvořili. Formaldehyd se doporučuje jako krajní řešení a ještě v omezeném časovém intervalu. Probíhá v něm neustálý rozklad uchovaných tkání, takže čas jeho působení hraje u preparátů podstatnou roli. Protože se nepodařilo získat snímky na elektronovém mikroskopu, nebyla provedena měření stereologickými metodami, která bychom mohly porovnat s již získanými výsledky vláknitých struktur. Pomocí optického mikroskopu jsme získaly snímky decelularizovaných a nedecelularizovaných tkání (obrázek č.38). Tím, že u preparátu nebylo možné vytvořit super rovné řezy, nebylo možné použít většího zvětšení a další měření, s ohledem na nemožnost zaostření, nebylo možné. Nedecelularizované tkáně byly připraveny pro lepší porovnání a vyhodnocení úspěšnosti chemické decelularizace. Bohužel i tyto snímky byly pořízeny optickou mikroskopií a pro porovnání tudíž nebylo možné.



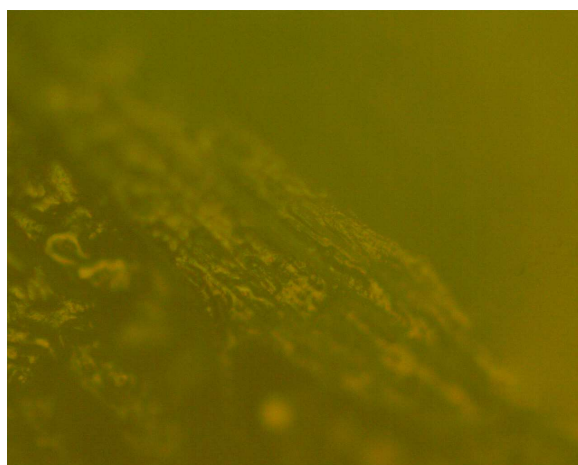
(a)



(b)



(c)



(d)

Obr.č.38: Snímky tkání získané optickou mikroskopií (a) decelularizovaná tkáň krční arterie (b) nedecelularizované tkáň krční arterie (c) decelularizovaná tkáň chrupavky hrtanu (d) nedecelularizovaná tkáň chrupavky hrtanu

## 4 ZÁVĚR

Práce se zabývala studiem struktur tkáňových nosičů pomocí stereologických metod. Stereologie jako vědní obor zabývající se zjišťováním parametrů struktury, nám poskytla vhodné aparáty pro hodnocení vláknenných struktur. Rešeršní část této práce se zaměřila jednak na popis těch nejzákladnějších stereologických metod, dále pak na výrobu a praktické využití tkáňových nosičů, které jsou v dnešní době předmětem zájmu v oblasti výzkumu, a zvolila se metoda přípravy vláknenných struktur pomocí elektrostatického zvlákňování, které se v experimentální části podařilo připravit. Poslední bod rešeršní části byl věnován decelularizaci tkání, při které se získáním ECM získává i vhodný nosič pro kultivaci nových buněk. Aplikací postupu chemické decelularizace na vybrané tkáně se v experimentální části připravily vzorky.

V experimentální část se jednak zabývala výrobou vláknenných struktur metodou elektrostatického zvlákňování a dále přípravou decelularizovaných tkání. Elektrostatické zvlákňování probíhalo za stejných podmínek pouze v různých časových intervalech a to 3s, 5s, 10s, 15s, 20, 25s. Každé jednotlivé vzorky se dále rozdělily na 5 podvzorků odebraných z různých částí a vzniklo tím 30 snímků připravených pro aplikaci stereologických metod.

Experimenty, které probíhaly měřením obrazovou analýzou, prokázaly, že u průměrů vláken se hodnoty lišily jen velmi málo. Stejně tak bylo prokázáno, že všechny připravené vláknenné struktury jsou anizotropní. Směrové orientace bylo možné posoudit několika metodami. Jednou z metod byla grafická experimentální metoda odhadu anizotropie ve formě směrové růžice konstrukcí Steinerova kompaktu. Další dvě metody určování směrové orientace byly založené na Fourierově transformaci a frekvenčních komponent Fourierova spektra. Jednalo se o zjišťování anizotropie vláknenných struktur pomocí polárního diagramu a modifikovanou metodou pomocí elipsy. Obrazovou analýzou byly dále získány hodnoty délek a délkových hustot pomocí stereologické metody modifikované Buffonovy úlohy. Tyto hodnoty byly připraveny pro porovnání analýzy ECM tkání získané chemickou decelularizací.

Decelularizace probíhala na histologických vzorcích chrupavky hrtanu a krční arterie ovce., kde po aplikaci decelularizačního protokolu a vysušení byly tkáně připraveny na řezy. Tady se bohužel nepovedlo vzorky zalít do vhodného stabilizačního media a nezískaly se snímky pro elektronovou mikroskopii. Byly k dispozici pouze snímky optickou mikroskopií, na kterých nešlo provést další měření. Nebylo tudíž možné z morfologického hlediska porovnat vhodnost vyrobených vláknenných struktur se získanou ECM tkání.



Uvědomuji si, že měření a experimenty mohou obsahovat chyby způsobené lidským faktorem, zvláště když se většina stereologickým metod aplikací testovacího systému opírá o nutnost rozhodování měřitele o vhodnosti testovacích sond a o individuálním přístupu při posouzení jednotlivých případů. Věřím, že získané výsledky v této práci, i přes její nedostatky, budou využity k dalšímu studiu.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Liu, C., Xia, Z., Czernuszka, J.T.: Design and Development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, Chemical Engineering Research and Design, Vol. 85, No. 7. (2007)
- [2] Brown, P.J., Stevens, K.: Nanofibers and nanotechnology in textiles, Woodhead Publishing 2007
- [3] Kolektiv autorů - Lékařské textilie 1. a 2. díl, Centrum pro podporu konkurenceschopnosti v biomedicínských technologiích, Vydala Asociace inovačního podnikání ČR
- [4] Dostupné na: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/biokompatibilita>
- [5] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Izomerie>
- [6] Tomková, B.: výukové texty: Speciální vlákna
- [7] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P. : Základy buněčné biologie - úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing, 2. vyd., 2005, 740 str
- [8] Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., Badylak, S.F.: Decellularization of tissues and organs, PubMed- indexed for MEDLINE, 2006 Jul;27(19):3675-83.
- [9] Guo-feng, L., Zhi-juan, H., Da-ping, Y., Xue-feng, H., Tie-fang, G., Chen-guang, H., Hui, M., Chun-lei, N. : Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft, Pub Med – indexed for Medline, 2008 Aug 5;121(15):1398-406.
- [10] Georgie, J.H.S: Engineering of Fibrous Scaffolds for use in regenerative medicine, Department of Materials, Imperial College London, 2009
- [11] Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., Farson, D.: Electrospinning for tissue engineering scaffolds, Materials Science and Engineering C 27, 2007, 504–509.
- [12] Lukáš, D. et al., Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nanotechnology of the twenty-first century *scale*), Textile Progress, Vol. 41, No. 2, 2009, 78-83.
- [13] Čihák, Radomír. : Anatomie 1, Milan Med 1987
- [14] Višňa, P., Hart, R., a kolektiv : Chrupavka kolena, vydal MAXDORF s.r.o. 2006
- [15] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hrtan>
- [16] Čihák, Radomír. : Anatomie 2, Grada Publishing, spol. s r.o., 2002
- [17] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ceva>

- [18] Čihák, Radomír. : Anatomie 3, Grada Publishing, a.s., 2004
- [19] Lukáš, D.: Stereologie textilních materiálů. Skriptum. 2000 TU Liberec, č.p. 55-037-99.
- [20] Saxl, I.: Stereologie vnitřní struktury objektů, vydala Academia nakladatelství  
Československé akademie věd, Praha 1984
- [21] Russ, J.C., Dehoff, R.T.: Practical stereology (Second Edition). Published by Plenum  
Press, New York 2000, ISBN 0-306-46476-4.
- [22] Tonar, Z. :Atlas kvantitativní histologie, práce byla podporována grantem FRVŠ F3  
1071/2008 – září 2008
- [23] Garcia,Y., Breen,A., Burugapalli,K., Dockery,P., Pandit,A.: Stereological methods to  
assess tissue response for tissue-engineered scaffolds, Biomaterials vol. 28, 2007, 175–186.
- [24] Štefaničová, Z.: Směrová orientace vláknenných systémů, Technická Univerzita  
v Liberci, diplomová práce 2010
- [23] Tunak, M., Linka, A.- Analysis of Planar Anisotropy of Fibre Systems by Using 2D  
Fourier Transform, FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe, January / December 2007, Vol.  
15, No. 5 - 6 (64 - 65)
- [24] Schejbalová, H., Stibor I.: Úvod do studia organické a makromolekulární chemie,  
vydavatel Technická Univerzita v Liberci, 2004
- [25] Matoušek, T.: Stereologie nadmolekulární struktury polymerů, Univerzita Tomáše Bati  
ve Zlíně, bakalářská práce 2007
- [26] Pirichová, I.: Stereologie vláknenných materiálů, Technická Univerzita v Liberci,  
bakalářská práce 2010
- [27] Dostupné na: <http://www.ellipse.sk/>
- [28] Dostupné na: [http://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorid\\_vapenaty](http://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorid_vapenaty)

## 6 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 :      Tabulky

Příloha č. 2 :      Směrové vektory  
                         Směrové orientace a histogramy  
                         Polární diagramy a směrové růžice

## Příloha č.1

Tabulka č.6: Měření průměru vláken u vzorků zvlákňovaných 25 s.

Označení snímku	Minimum [ $\mu\text{m}$ ]	Maximum [ $\mu\text{m}$ ]	Stat.průměr vláken [ $\mu\text{m}$ ]
1A 0006	0,21	0,48	0,3618
1A 0007	0,14	0,52	0,3578
1A 0008	0,16	0,46	0,3105
1A 0009	0,23	0,53	0,3392
1A 0010	0,23	0,51	0,3303
1A 0011	0,21	0,54	0,3397
1B 0006	0,23	0,56	0,3807
1B 0007	0,16	0,46	0,3288
1B 0008	0,15	0,45	0,3084
1C 0001	0,17	0,44	0,293
1C 0006	0,15	0,5	0,2843
1C 0007	0,09	0,41	0,2978
1D 0007	0,13	0,58	0,2916
1D 0008	0,12	0,52	0,2882
1D 0009	0,14	0,46	0,2864
1E 0004	0,13	0,47	0,2859
1E 0005	0,17	0,56	0,2959
1E 0006	0,12	0,84	0,2844

Tabulka č.7: Měření průměru vláken u vzorků zvlákňovaných 20 s.

Označení snímku	Minimum [ $\mu\text{m}$ ]	Maximum [ $\mu\text{m}$ ]	Stat.průměr vláken [ $\mu\text{m}$ ]
2A 0005	0,28	0,56	0,4382
2B 0011	0,37	0,57	0,4817
2C 0008	0,23	0,57	0,4231
2D 0002	0,27	0,58	0,4467
2E 0008	0,33	0,49	0,4098
2E 0009	0,34	0,54	0,4364
2E 0010	0,29	0,53	0,4237

Tabulka č.8: Měření průměru vláken u vzorků zvlákňovaných 15 s.

Označení snímku	Minimum [ $\mu\text{m}$ ]	Maximum [ $\mu\text{m}$ ]	Stat.průměr vláken [ $\mu\text{m}$ ]
3A 0012	0,29	0,68	0,5239
3A 0013	0,39	0,67	0,505
3B 0009	0,36	0,63	0,5316
3B 0010	0,36	0,62	0,5193
3C 0001	0,33	0,6	0,4958
3C 0005	0,35	0,56	0,4466
3D 0006	0,43	0,7	0,5308
3D 0007	0,29	0,46	0,4181
3E 0003	0,35	0,69	0,4794
3E 0002	0,35	0,66	0,4735

Tabulka č.9: Měření průměru vláken u vzorků zvlákňovaných 10 s.

Označení snímku	Minimum [ $\mu\text{m}$ ]	Maximum [ $\mu\text{m}$ ]	Stat.průměr vláken [ $\mu\text{m}$ ]
4A 0009	0,23	0,53	0,3758
4A 0010	0,27	0,6	0,4503
4A0011	0,27	0,8	0,4326
4B 0010	0,35	0,58	0,4533
4B 0009	0,38	0,65	0,4816
4B 0008	0,26	0,52	0,416
4C 0007	0,35	0,6	0,4814
4C0008	0,4	0,58	0,5094
4C 0009	0,38	0,62	0,4955
4C 0010	0,43	0,61	0,522
4D 0007	0,22	0,59	0,4733
4D 0008	0,31	0,85	0,5278
4D 0009	0,38	0,65	0,5233
4D 0010	0,29	0,68	0,4853
4E 0007	0,2	0,54	0,3216
4E 0008	0,35	0,58	0,4617
4E 0009	0,24	0,59	0,4516
4E 0011	0,34	0,56	0,4029

Tabulka č.10: Měření průměru vláken u vzorků zvlákněvaných 5 s.

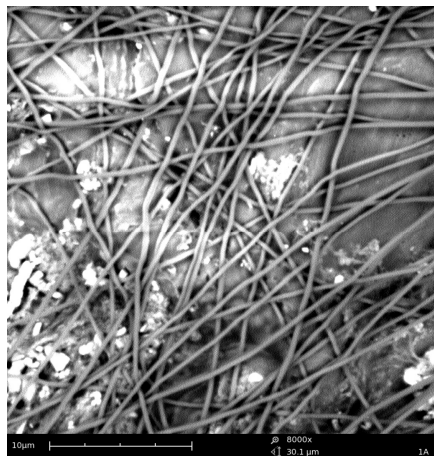
Označení snímku	Minimum μm]	Maximum μm]	Stat.průměr vláken [μm]
5A 0008	0,29	0,71	0,4665
5A 0009	0,25	0,82	0,4908
5A 0010	0,33	0,64	0,4675
5A 0011	0,45	0,8	0,5712
5B 0007	0,37	0,9	0,5062
5B 0008	0,2	0,97	0,5151
5B 0010	0,38	1,71	0,6195
5B 0011	0,29	0,55	0,423
5C 0001	0,31	0,6	0,4951
5C 0007	0,41	0,78	0,5874
5C 0008	0,26	0,67	0,4979
5C 0009	0,25	0,82	0,5425
5D 0007	0,29	0,63	0,4434
5D 0008	0,17	0,6	0,4518
5D 0009	0,43	0,83	0,5107
5D 0010	0,28	0,66	0,503
5E 0007	0,32	0,58	0,4355
5E 0008	0,38	0,99	0,5171
5E 0009	0,39	0,98	0,5905
5E 0010	0,29	0,96	0,4767

Tabulka č.11: Měření průměru vláken u vzorků zvlákněvaných 3 s.

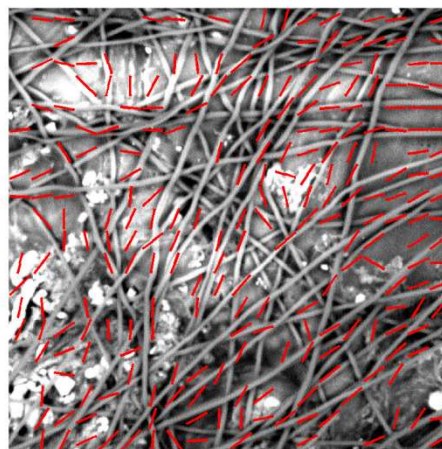
Označení snímku	Minimum μm]	Maximum μm]	Stat.průměr vláken [μm]
6A	0,24	0,45	0,356
6B 0001	0,33	0,79	0,5314
6B 0002	0,28	0,6	0,454
6C	0,23	0,49	0,3456
6D	0,25	0,51	0,467
6E	0,29	0,34	0,3275

## Příloha č.2

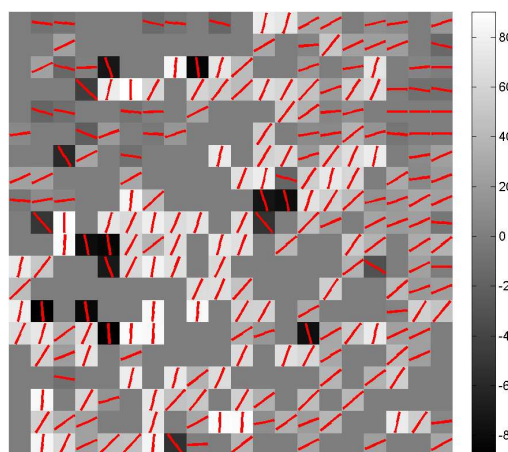
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 1A 0010:



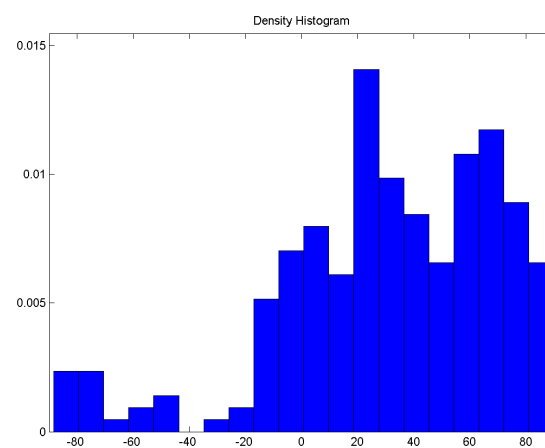
Obr.č.39: Vláknenná struktura



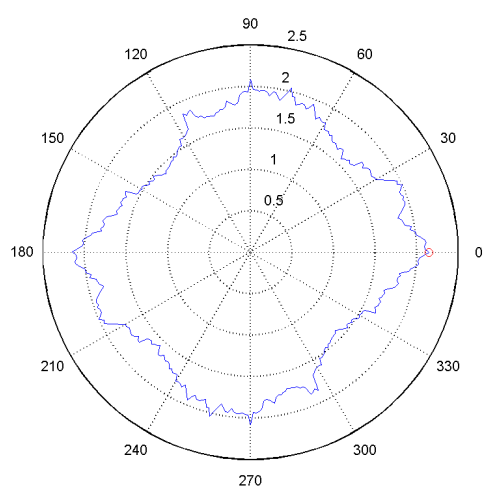
Obr.č.40: Směrové vektory



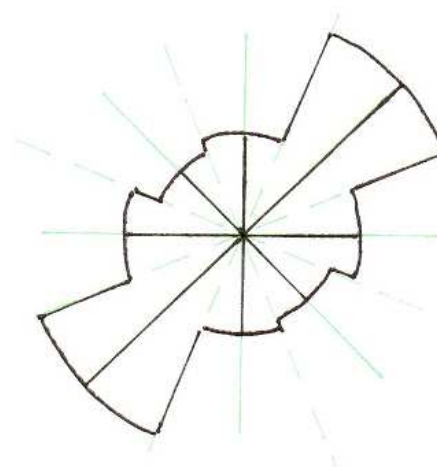
Obr.č.41: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.42: Graf. znázornění směrové orientace



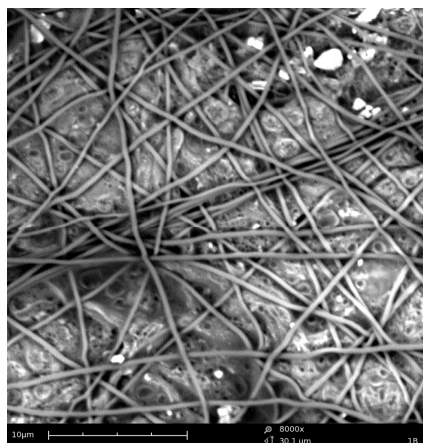
Obr.č.43: Polární diagram



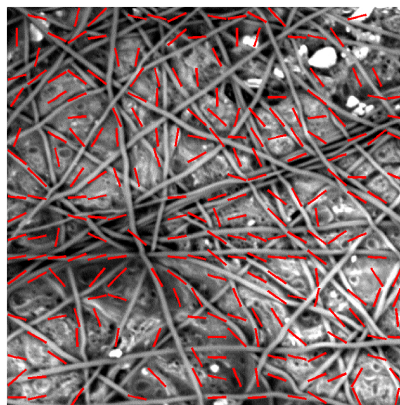
Obr.č.44: Směrová růžice



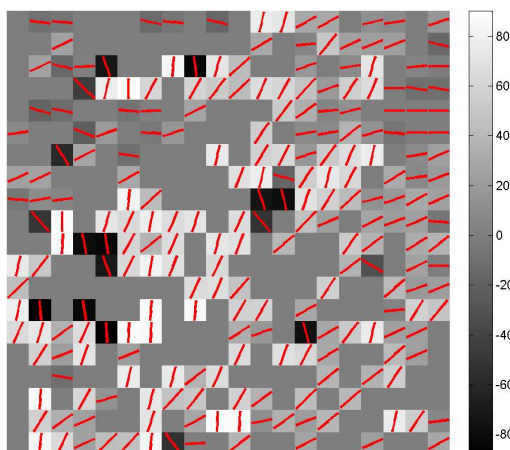
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 1B 0008:



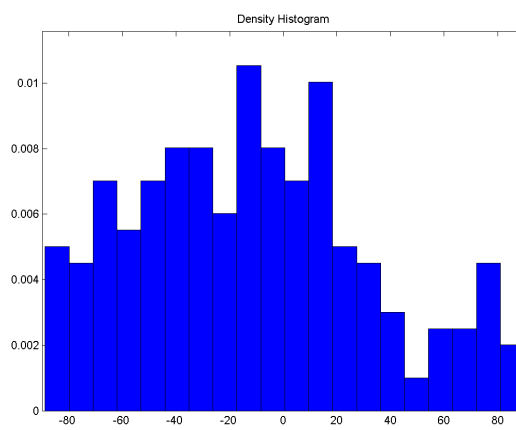
Obr.č.45: Vláknenná struktura



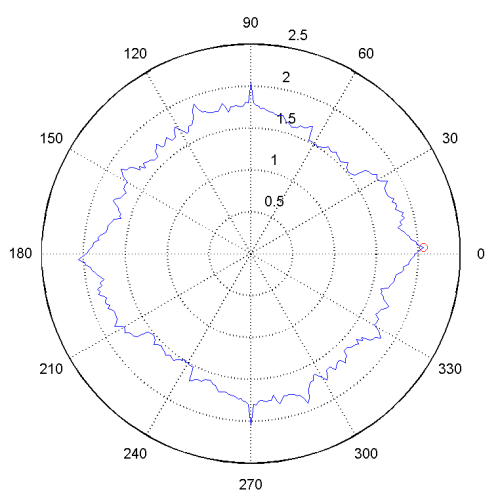
Obr.č.46: Směrové vektory



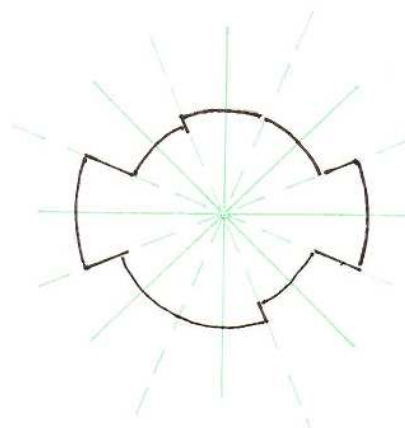
Obr.č.47: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.48: Graf. znázornění směrové orientace

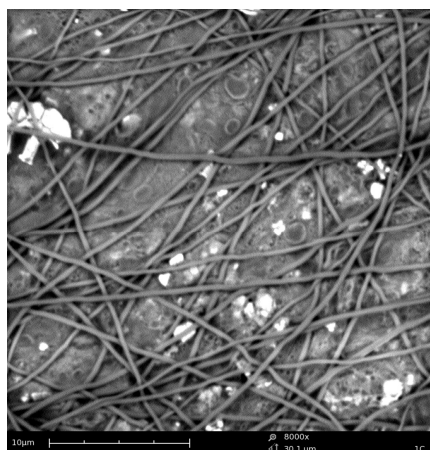


Obr.č.49: Polární diagram

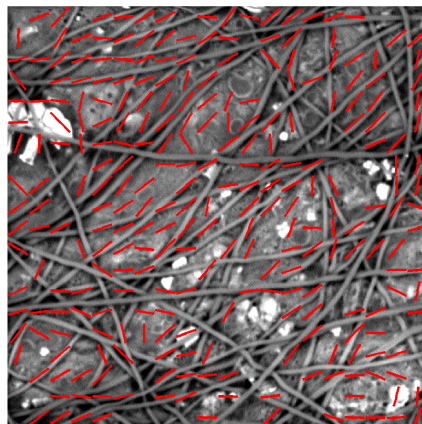


Obr.č.50: Směrová růžice

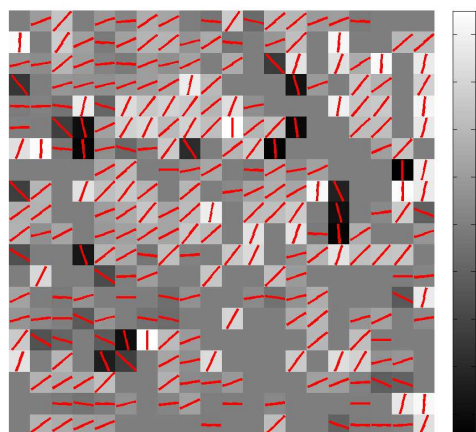
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 1C 0001:



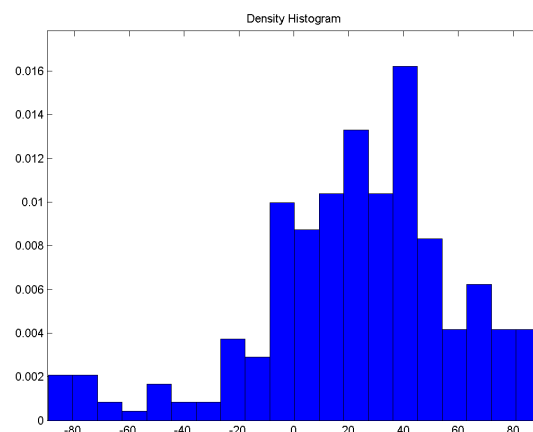
Obr.č.51: Vláknenná struktura



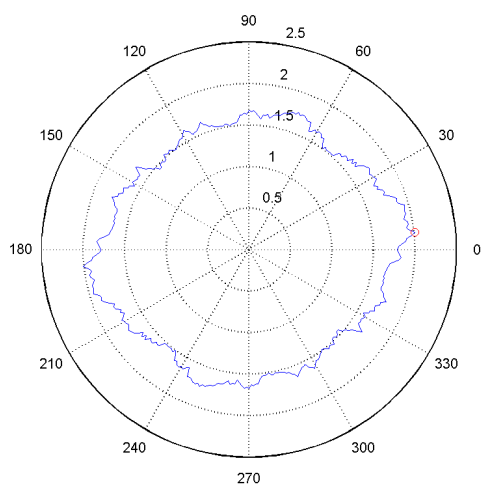
Obr.č.52: Směrové vektory



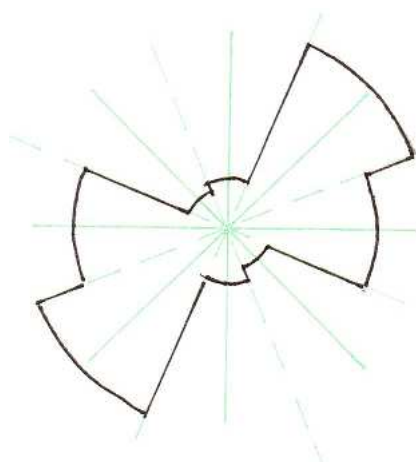
Obr.č.52: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.54: Graf. znázornění směrové orientace

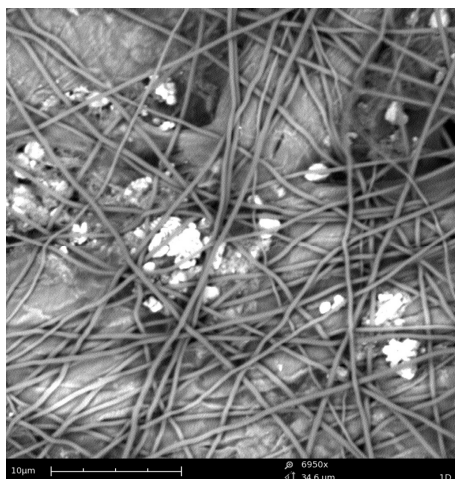


Obr.č.55: Polární diagram

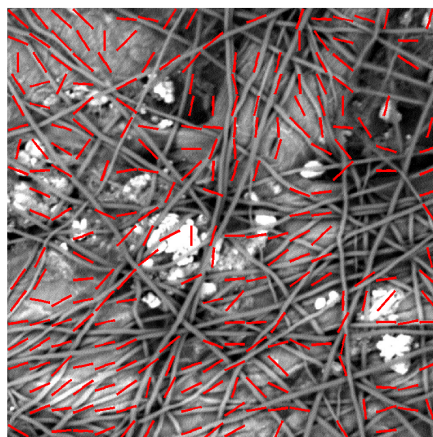


Obr.č.56: Směrová růžice

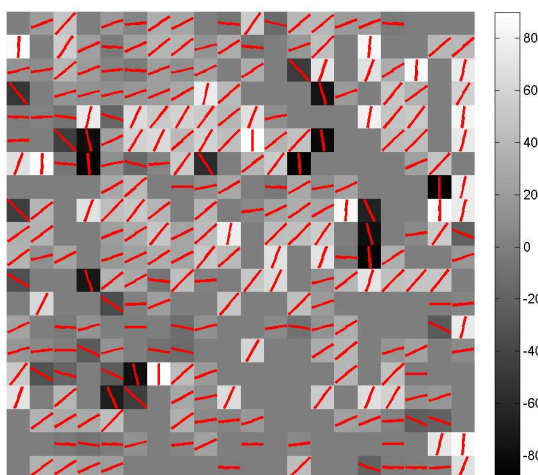
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 1D 0009:



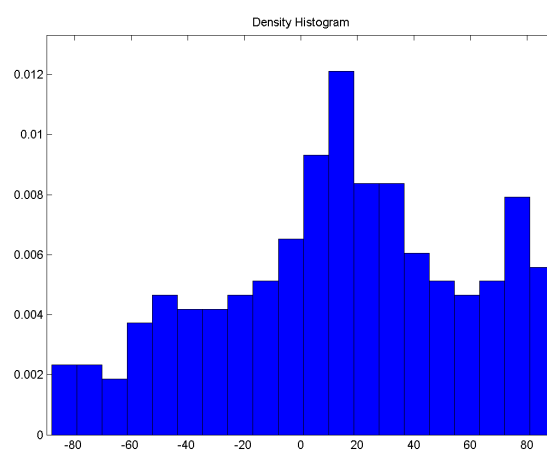
Obr.č.57: Vláknenná struktura



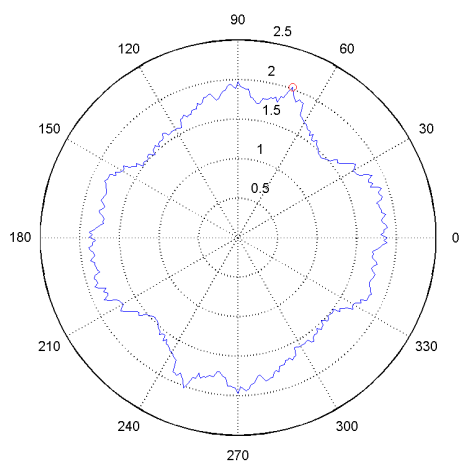
Obr.č.58: Směrové vektory



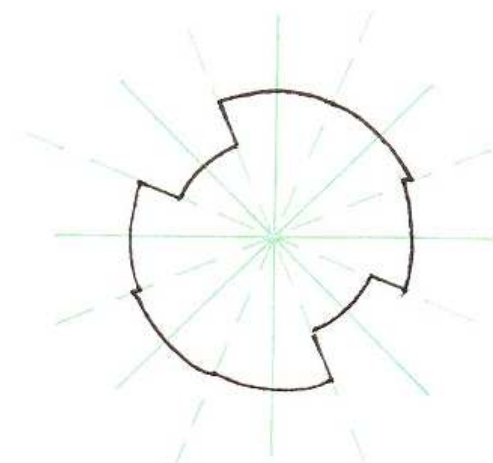
Obr.č.59: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.60: Graf. znázornění směrové orientace



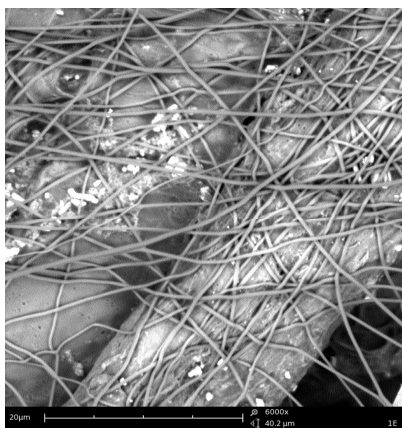
Obr.č.61: Polární diagram



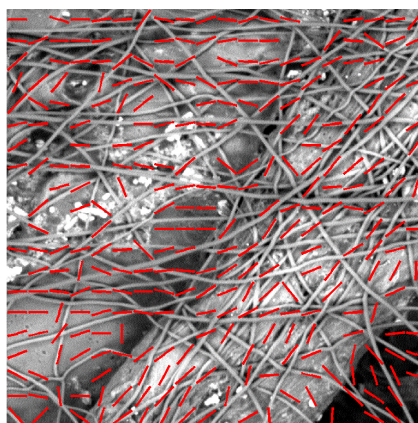
Obr.č.62: Směrová růžice



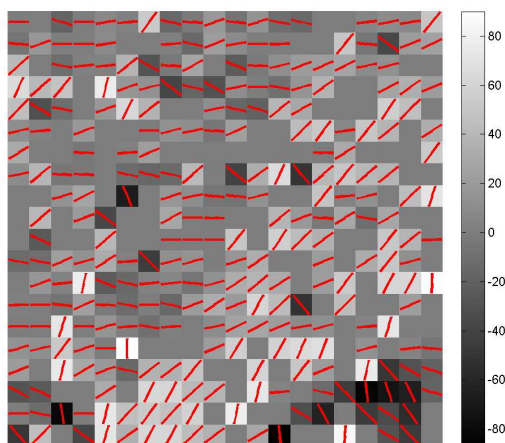
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 1E 0004:



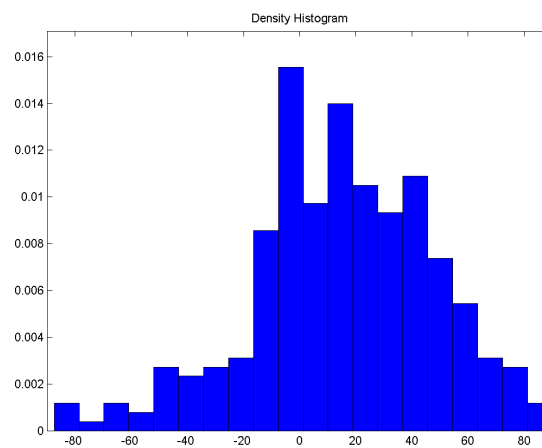
Obr.č.63: Vláknenná struktura



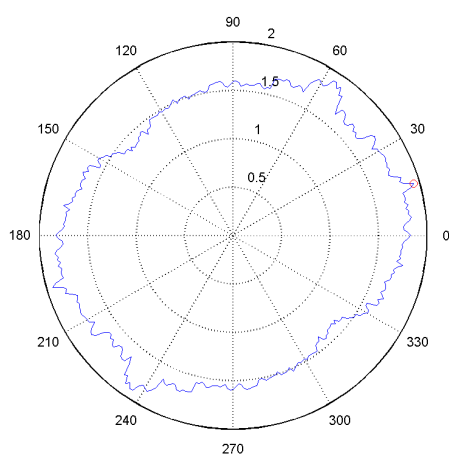
Obr.č.64: Směrové vektory



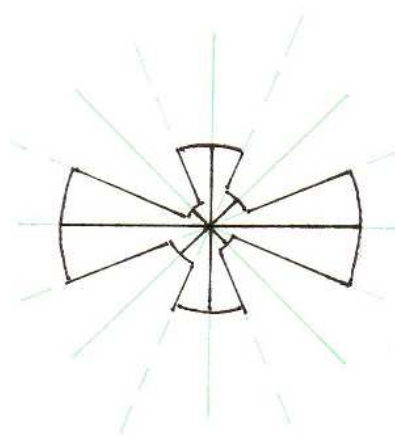
Obr.č.65: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.66: Graf. znázornění směrové orientace

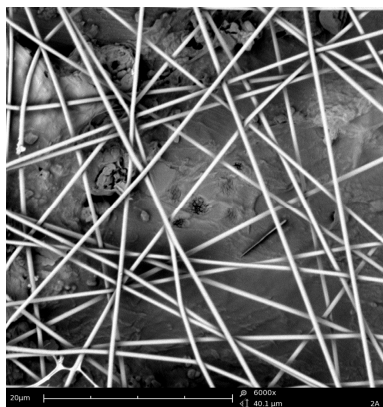


Obr.č.67: Polární diagram

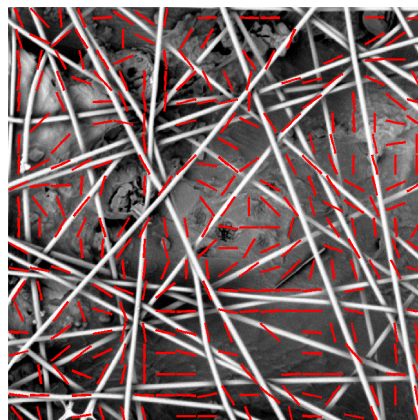


Obr.č.68: Směrová růžice

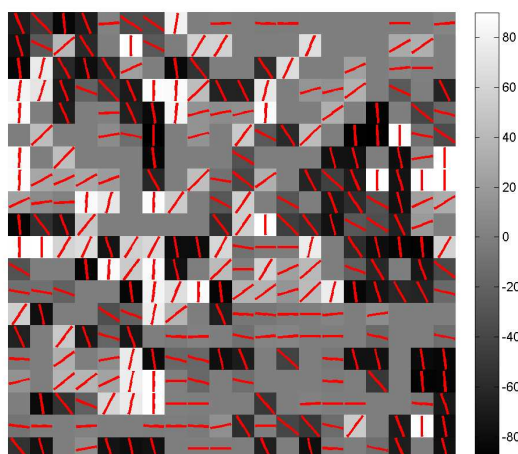
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 2A 0005:



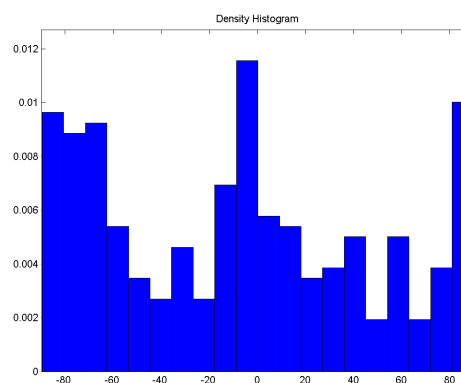
Obr.č.69: Vláknenná struktura



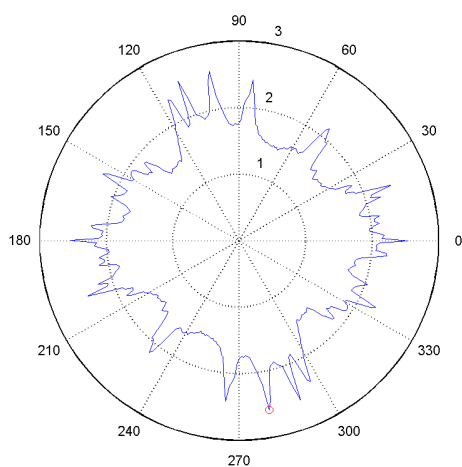
Obr.č.70: Směrové vektory



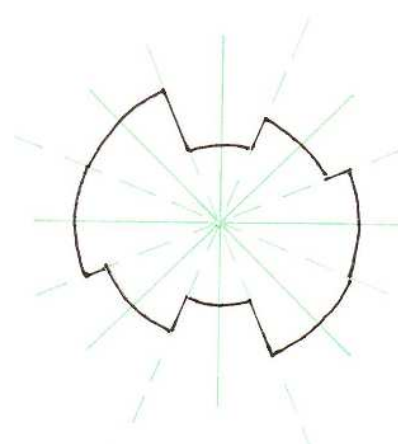
Obr.č.71: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.72: Graf. znázornění směrové orientace



Obr.č.73: Polární diagram

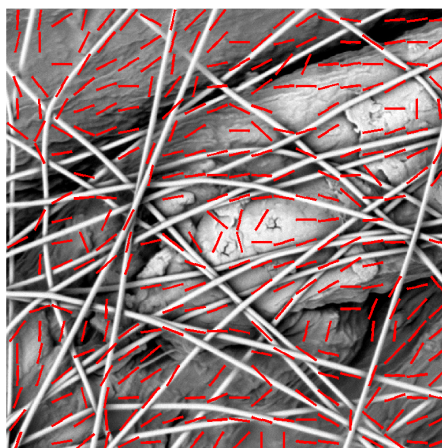


Obr.č.74: Směrová růžice

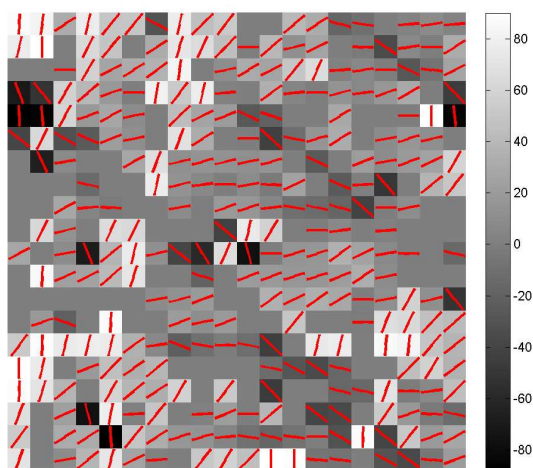
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 2B 0011:



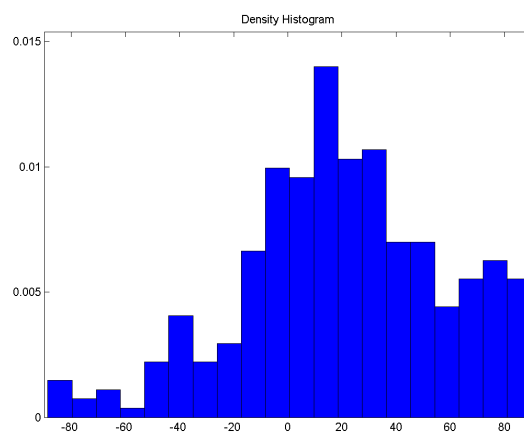
Obr.č.75: Vláknenná struktura



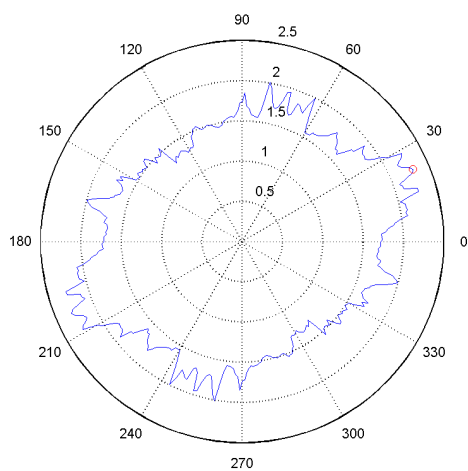
Obr.č.76: Směrové vektory



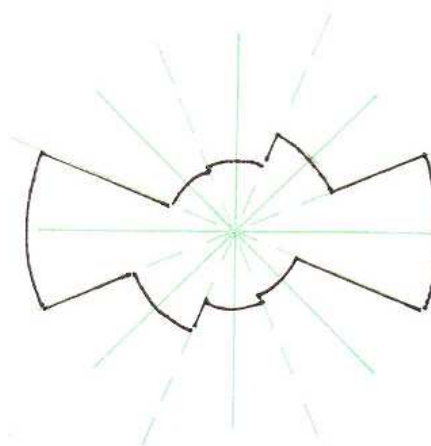
Obr.č.77: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.78: Graf. znázornění směrové orientace



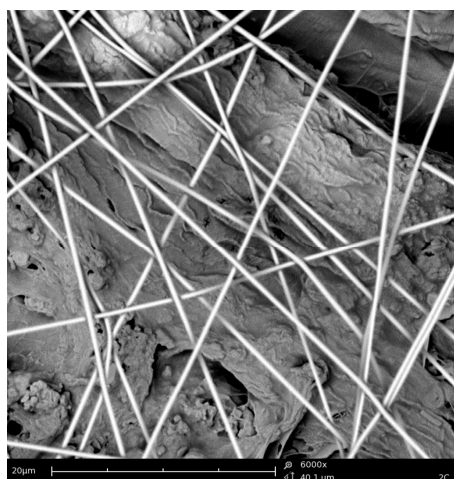
Obr.č.79: Polární diagram



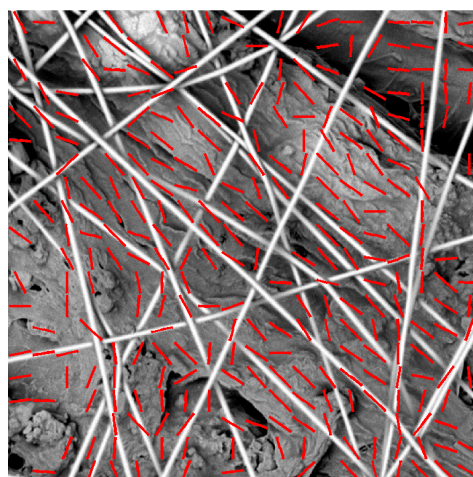
Obr.č.80: Směrová růžice



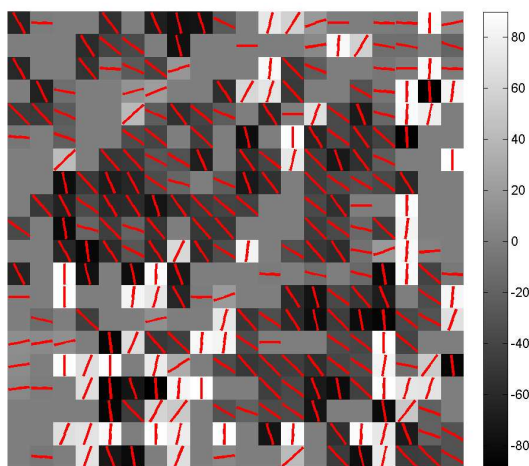
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 2C 0007:



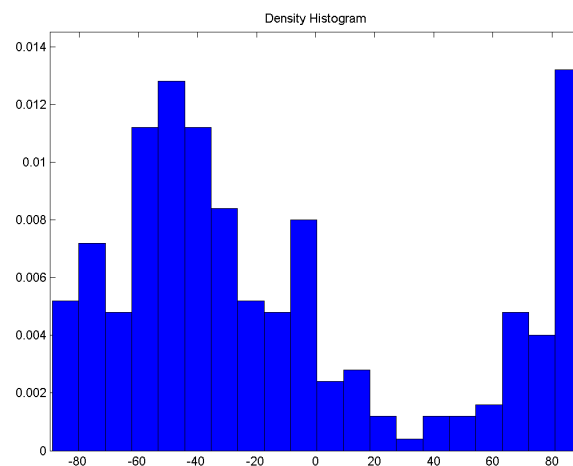
Obr.č.81: Vláknenná struktura



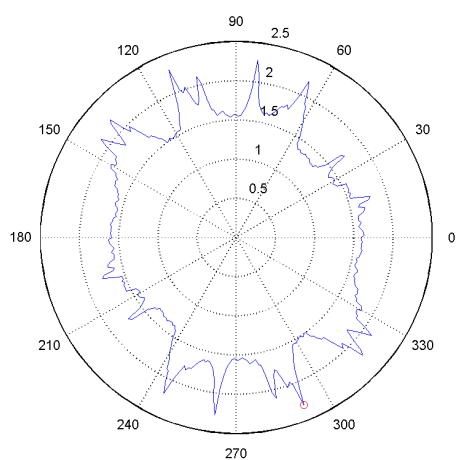
Obr.č.82: Směrové vektory



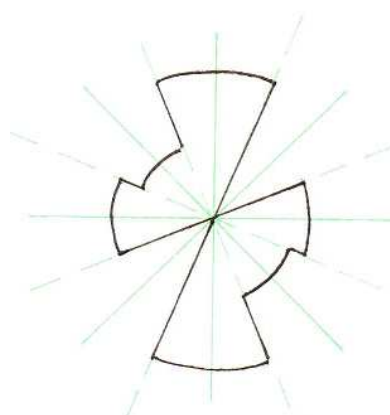
Obr.č.83: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.84: Graf. znázornění směrové orientace

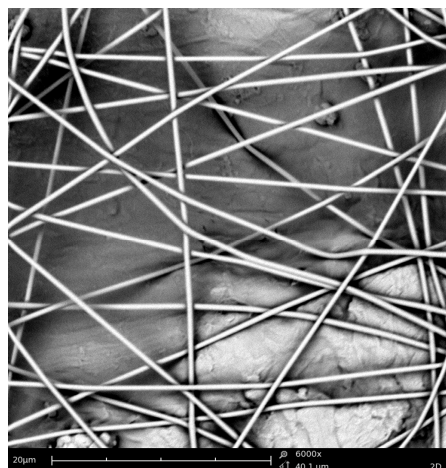


Obr.č.85: Polární diagram

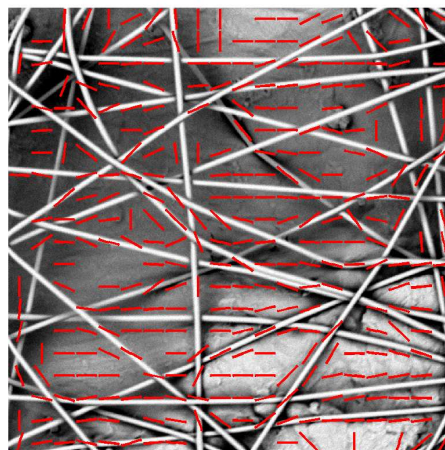


Obr.č.86: Směrová růžice

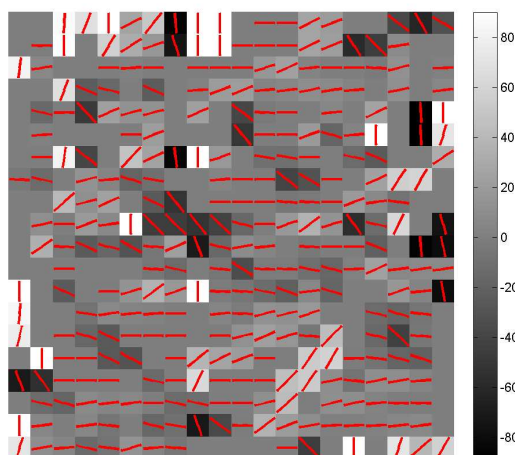
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 2D 0002:



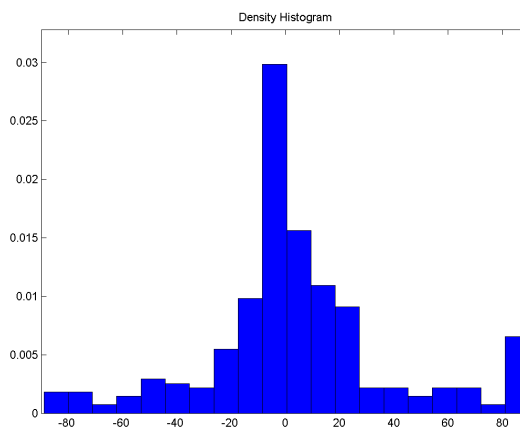
Obr.č.87: Vláknenná struktura



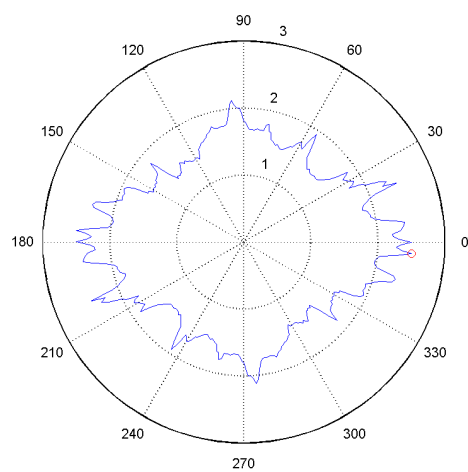
Obr.č.88: Směrové vektory



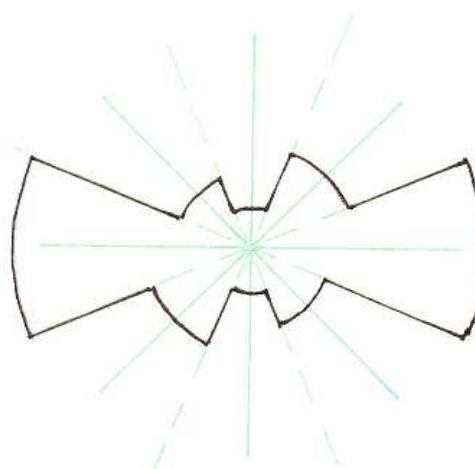
Obr.č.89: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.90: Graf. znázornění směrové orientace



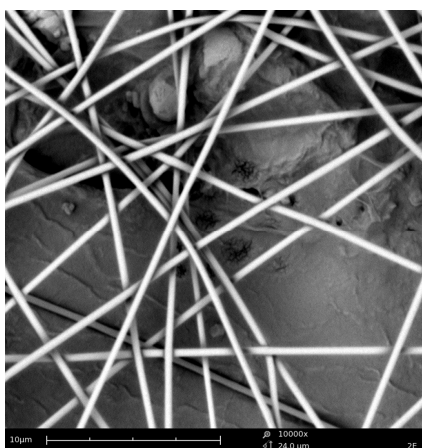
Obr.č.91: Polární diagram



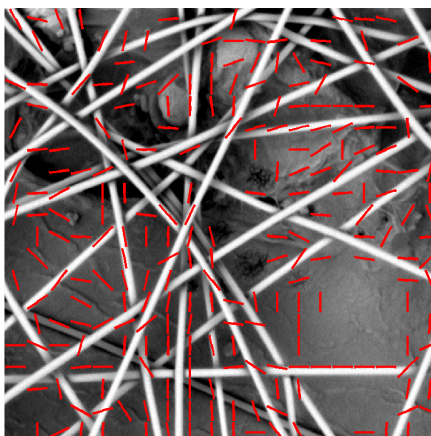
Obr.č.92: Směrová růžice



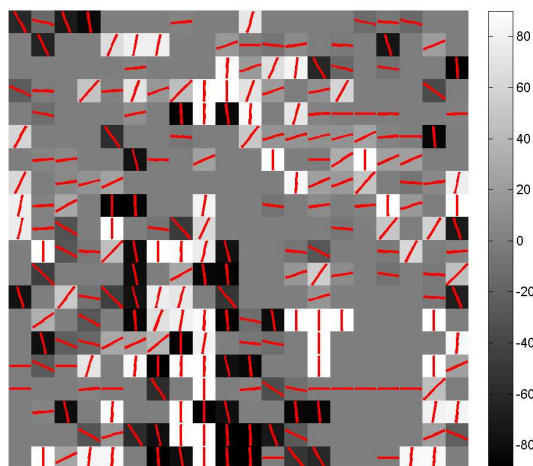
Směrová orientace vlákněných útvarů - snímek 2E 0008:



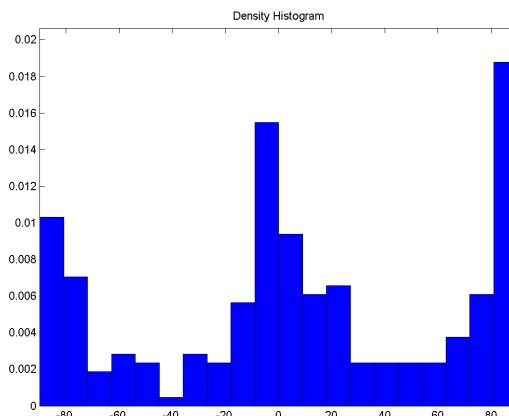
Obr.č.93: Vlákněná struktura



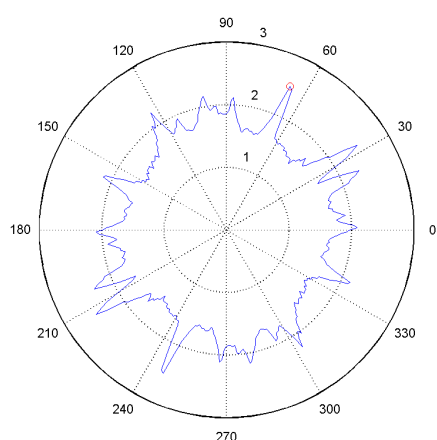
Obr.č.94: Směrové vektory



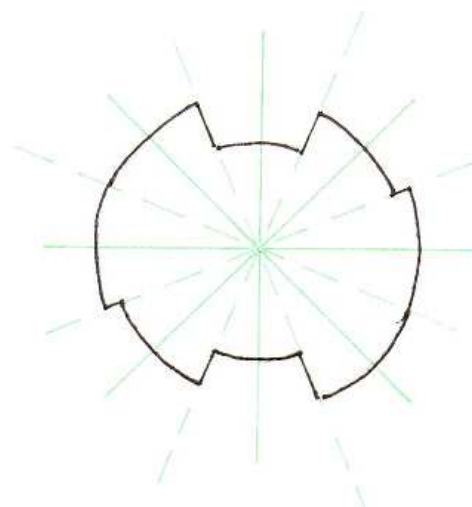
Obr.č.95: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.96: Graf. znázornění směrové orientace

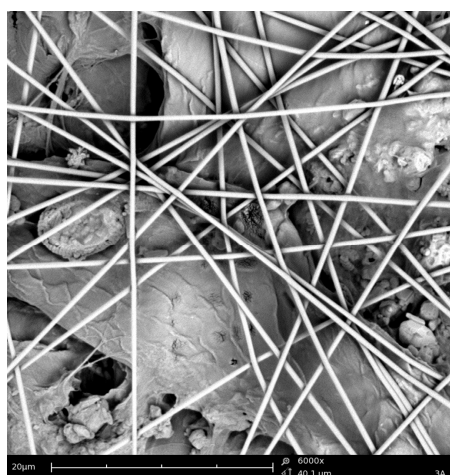


Obr.č.97: Polární diagram

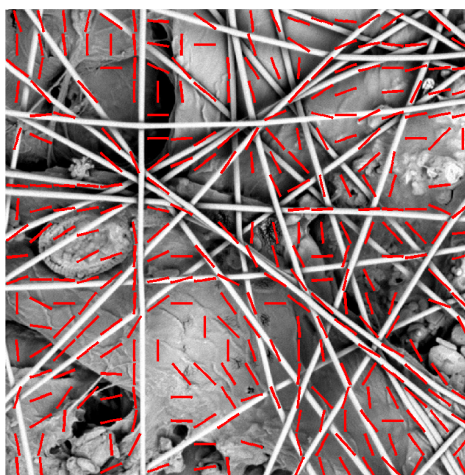


Obr.č.98: Směrová růžice

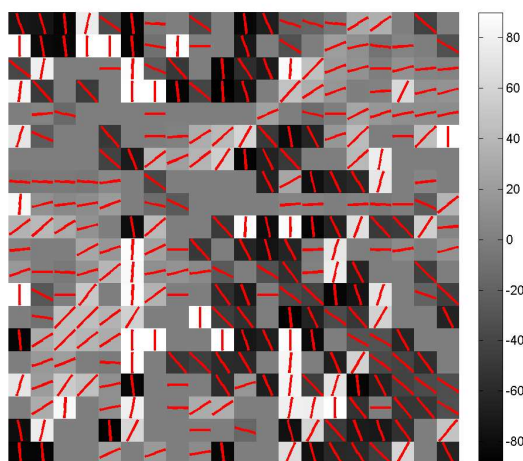
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 3A 0014:



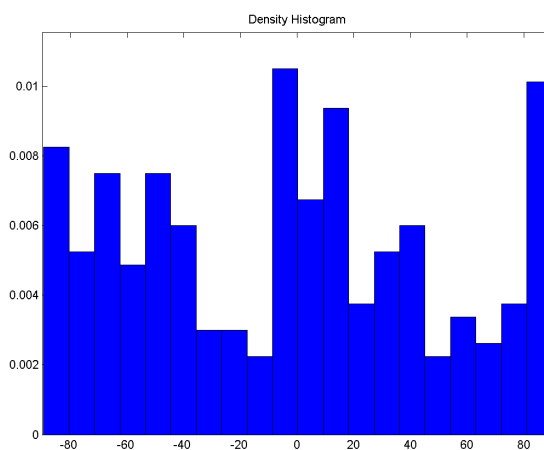
Obr.č.99: Vláknenná struktura



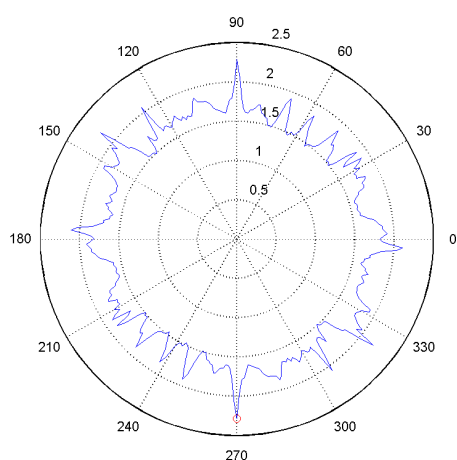
Obr.č.100: Směrové vektory



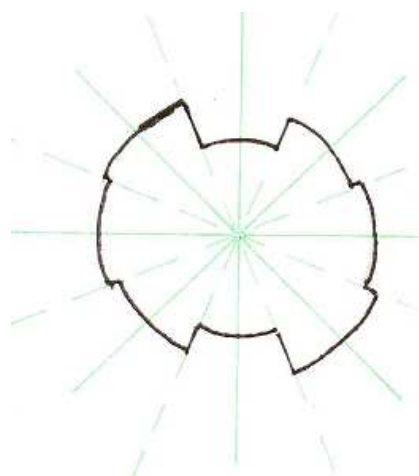
Obr.č.101: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.102: Graf. znázornění směrové orientace

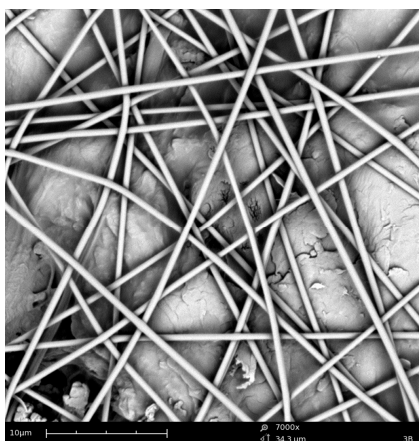


Obr.č.103: Polární diagram

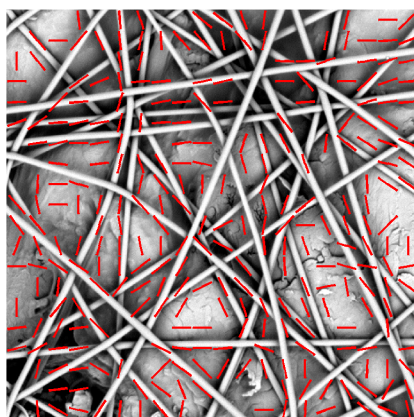


Obr.č.104: Směrová růžice

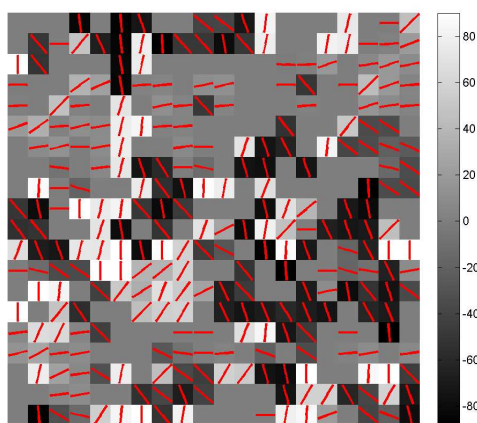
Směrová orientace vlákněných útvarů - snímek 3B 0009:



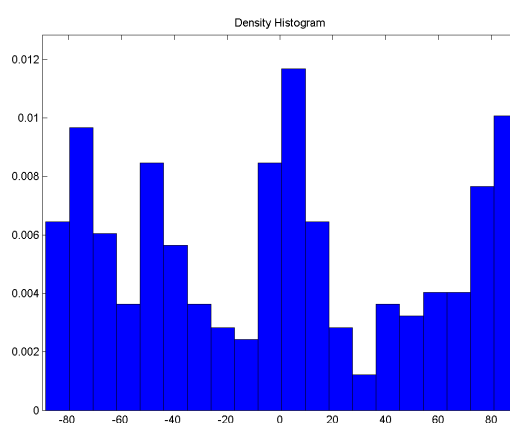
Obr.č.105: Vlákněná struktura



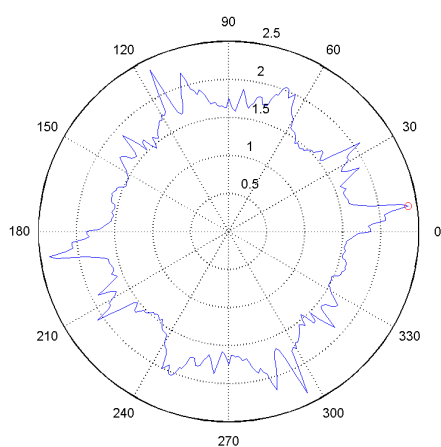
Obr.č.106: Směrové vektory



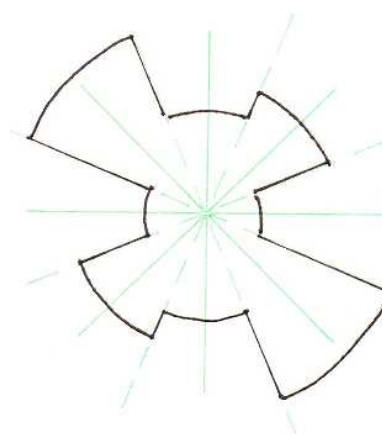
Obr.č.107: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.108: Graf. znázornění směrové orientace



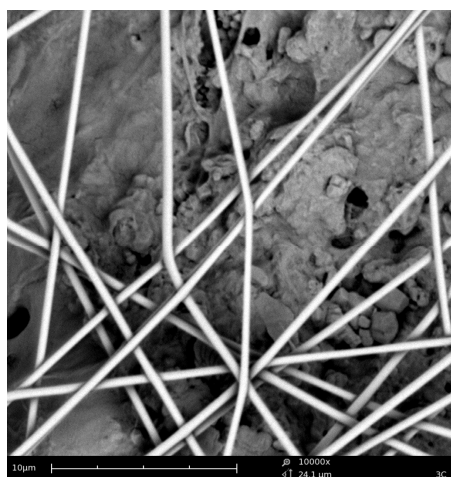
Obr.č.109: Polární diagram



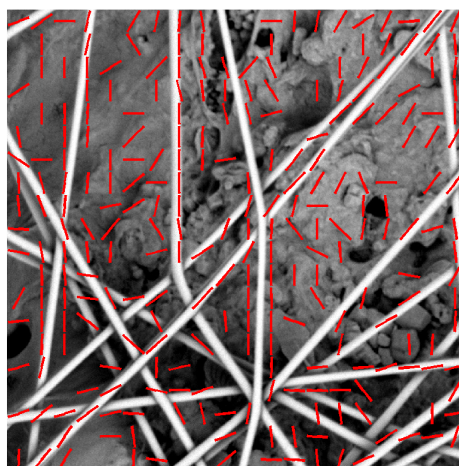
Obr.č.110: Směrová růžice



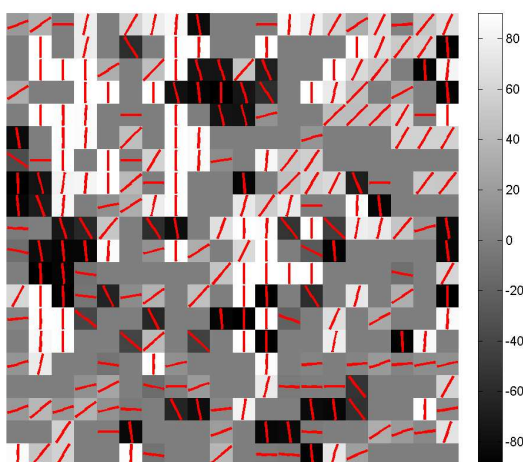
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 3C 0005:



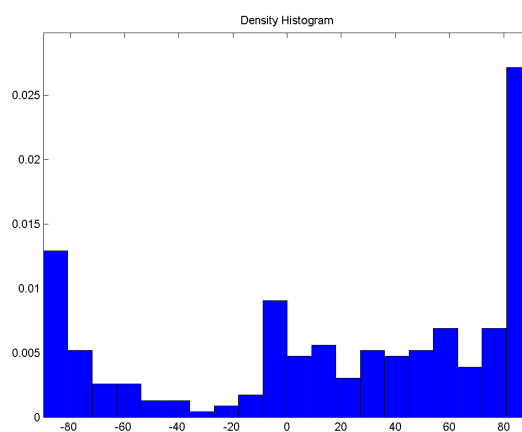
Obr.č.110: Vláknenná struktura



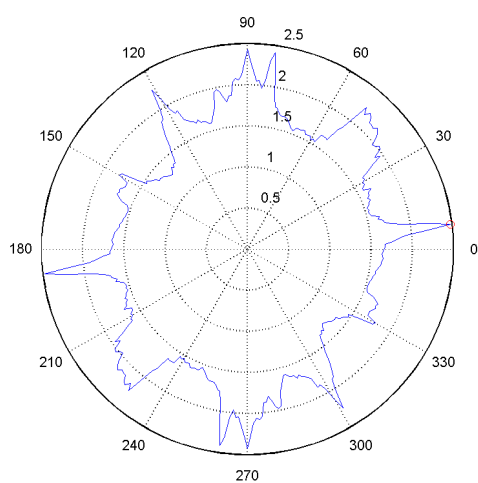
Obr.č.112: Směrové vektory



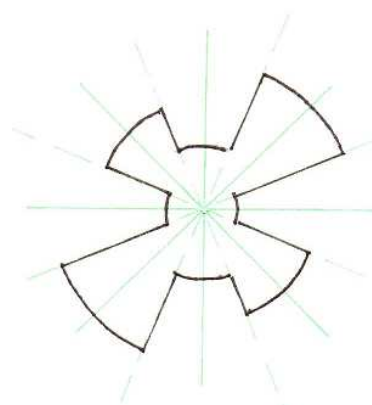
Obr.č.113: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.114: Graf. znázornění směrové orientace

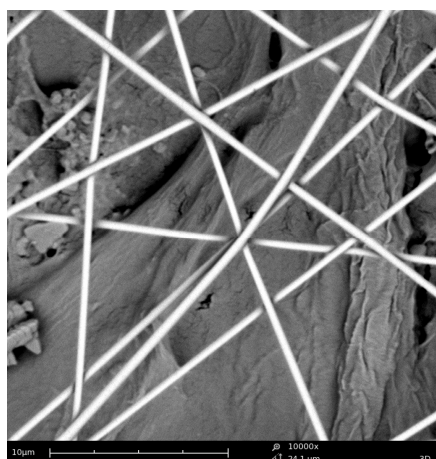


Obr.č.115: Polární diagram

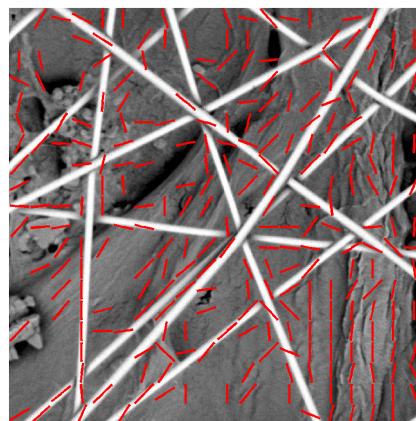


Obr.č.116: Směrová růžice

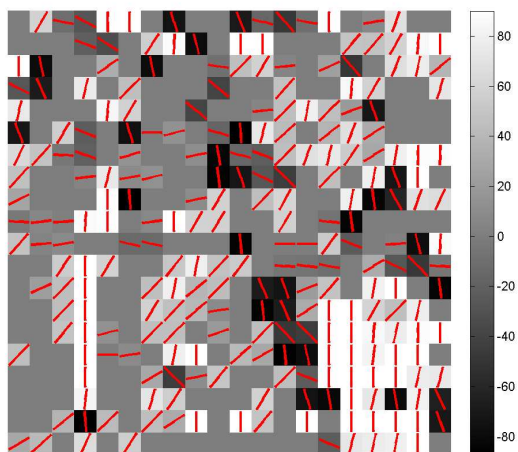
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 3D 0008:



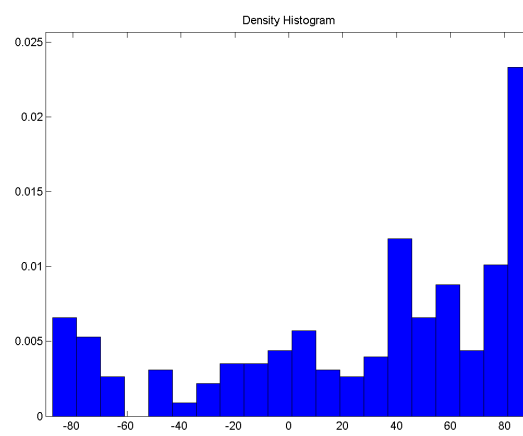
Obr.č.117: Vláknenná struktura



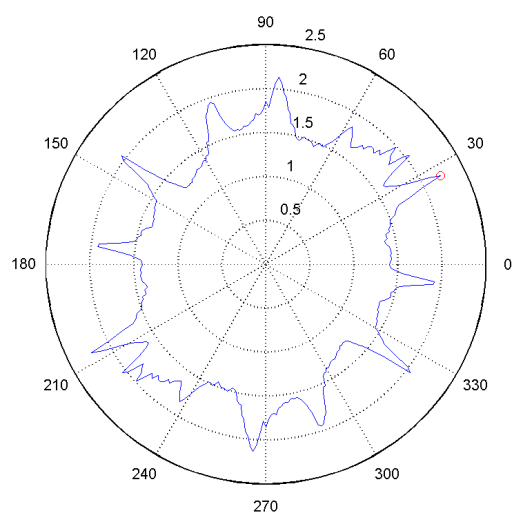
Obr.č.118: Směrové vektory



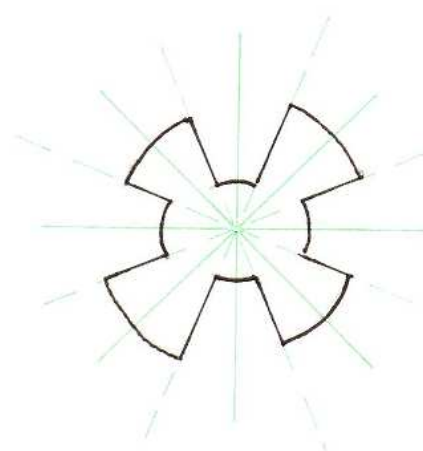
Obr.č.119: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.120: Graf. znázornění směrové orientace

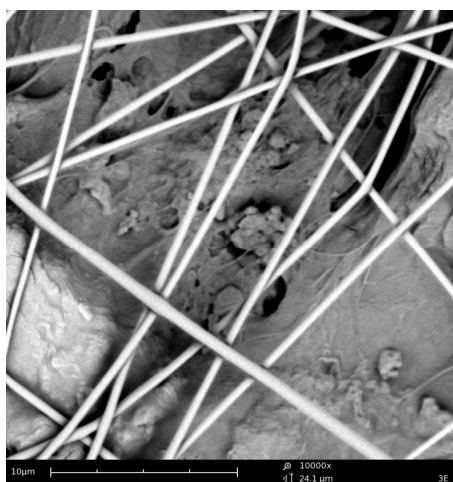


Obr.č.121: Polární diagram

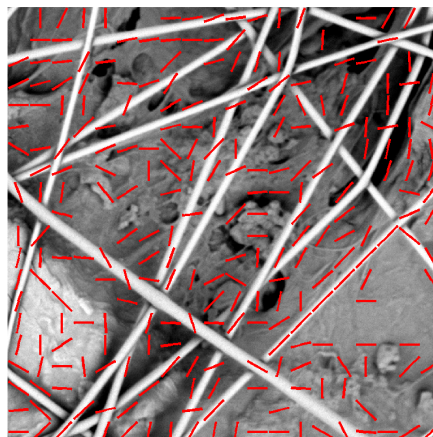


Obr.č.122: Směrová růžice

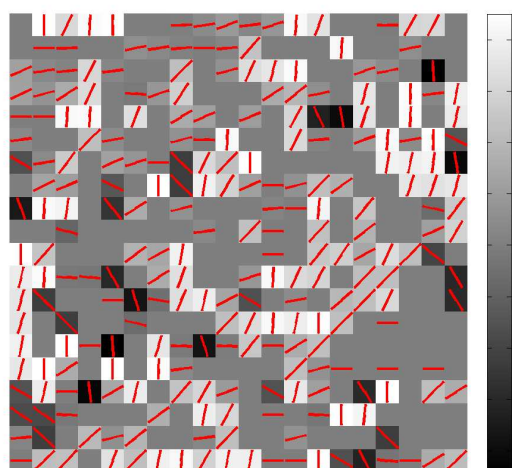
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 3E 0001:



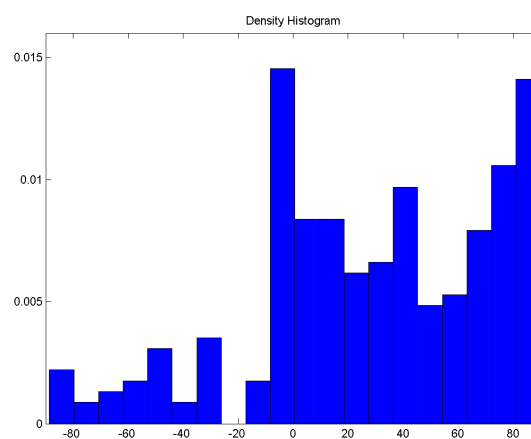
Obr.č.:123 Vláknenná struktura



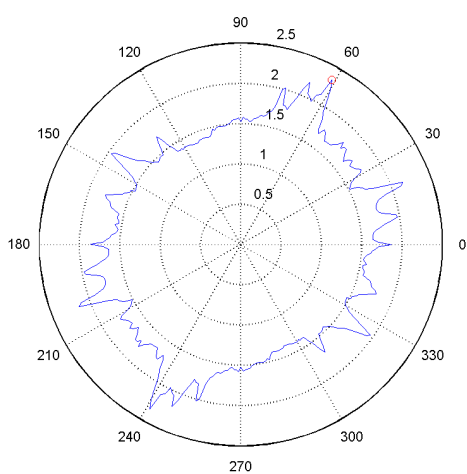
Obr.č.124: Směrové vektory



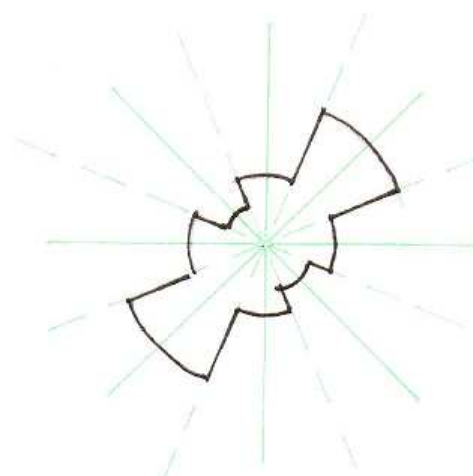
Obr.č.125: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.126: Graf. znázornění směrové orientace



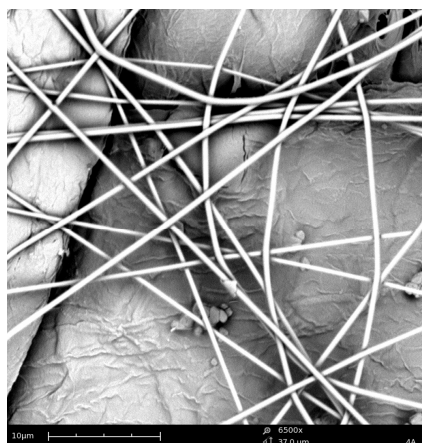
Obr.č.127: Polární diagram



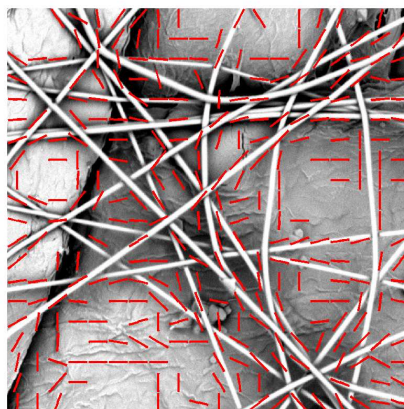
Obr.č.128: Směrová růžice



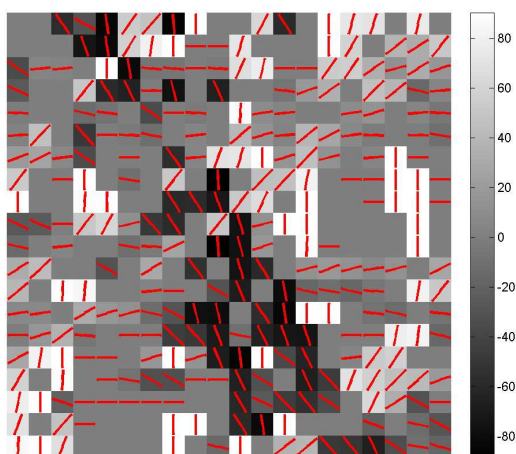
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 4A 0009:



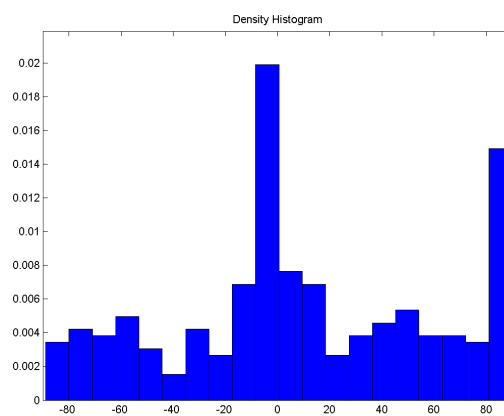
Obr.č.129: Vláknenná struktura



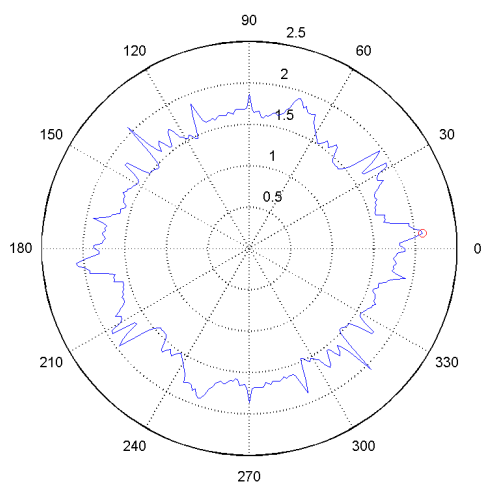
Obr.č.130: Směrové vektory



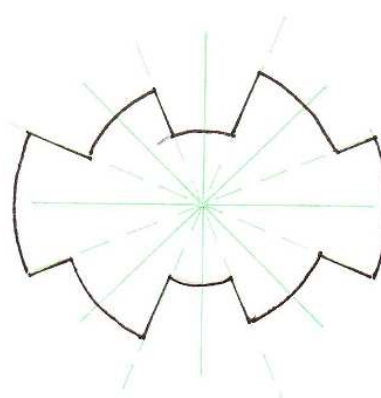
Obr.č.131: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.132: Graf. znázornění směrové orientace

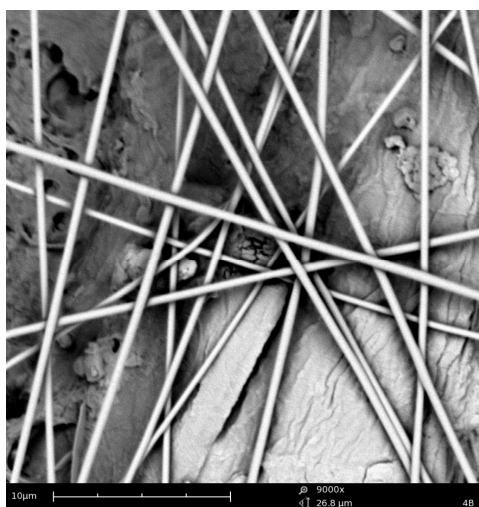


Obr.č.133: Polární diagram

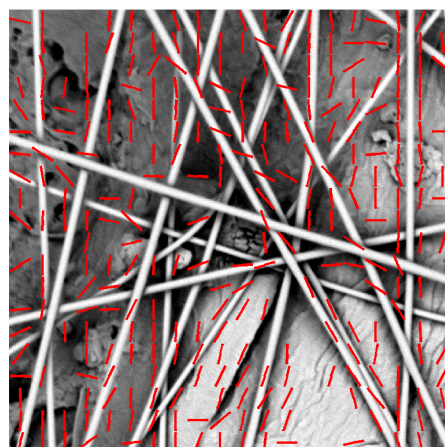


Obr.č.134: Směrová růžice

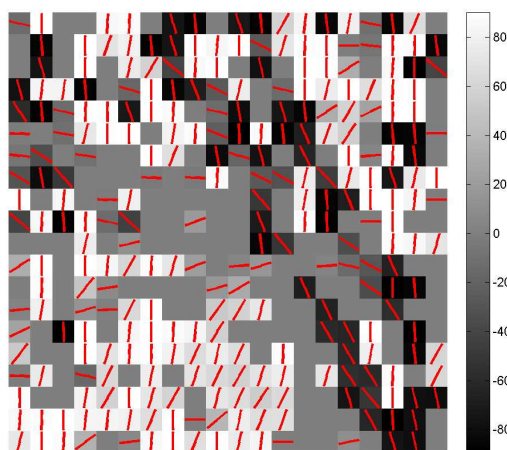
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 4B 0010:



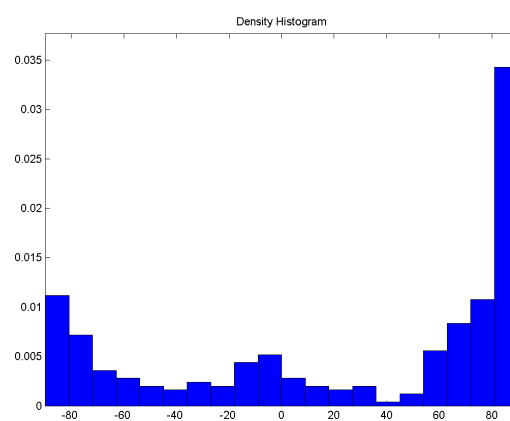
Obr.č.135: Vláknenná struktura



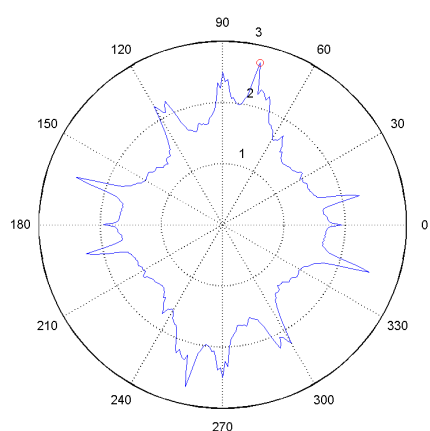
Obr.č.136: Směrové vektory



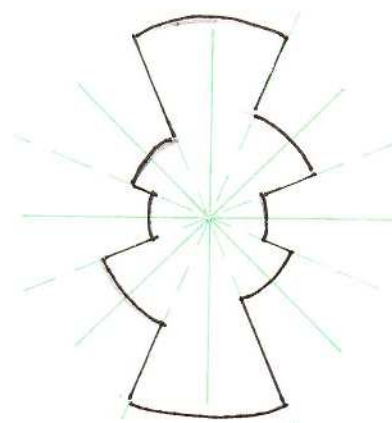
Obr.č.137: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.138: Graf. znázornění směrové orientace



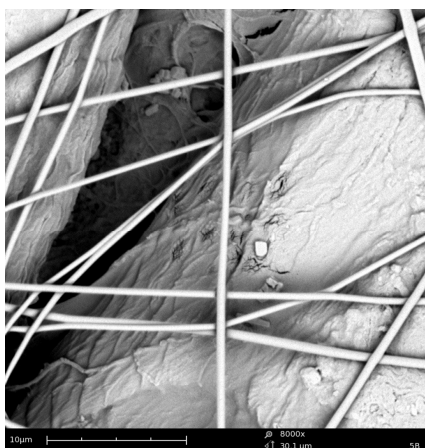
Obr.č.139: Polární diagram



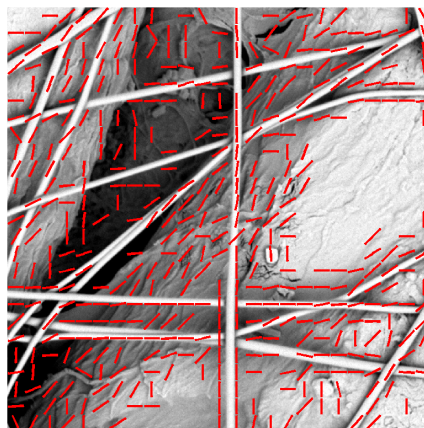
Obr.č.140: Směrová růžice



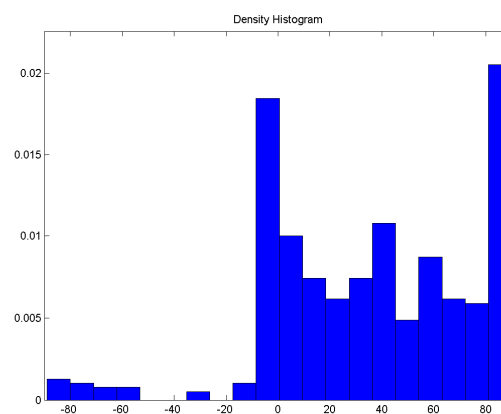
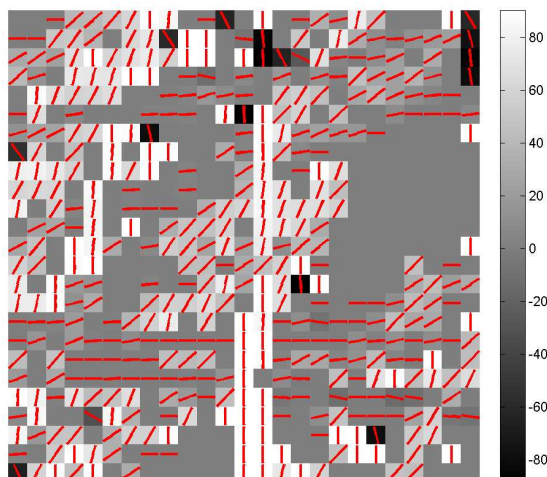
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 4C 0009:



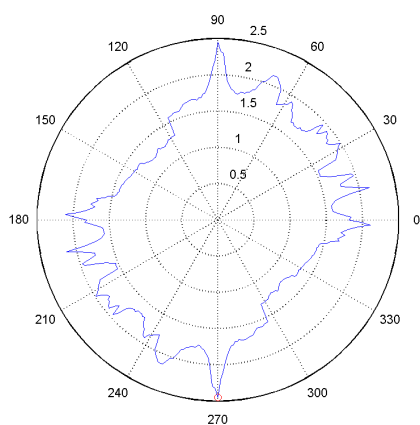
Obr.č.141: Vláknenná struktura



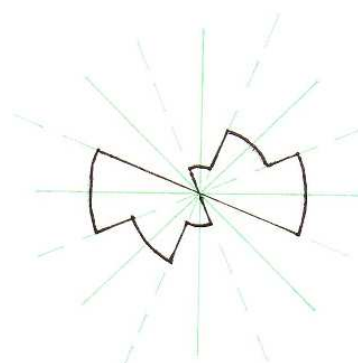
Obr.č.142: Směrové vektory



Obr.č.143: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.144: Graf. znázornění směrové orientace

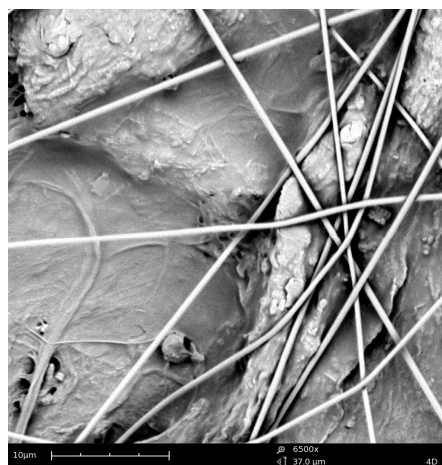


Obr.č.145: Polární diagram

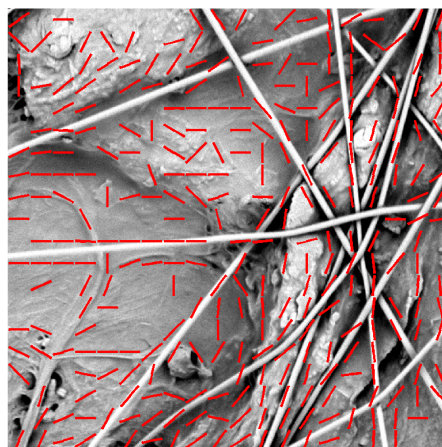


Obr.č.146: Směrová růžice

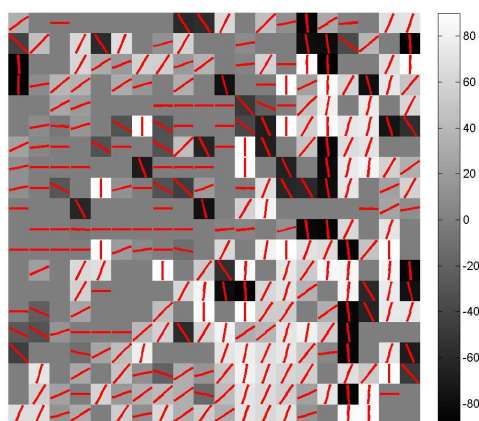
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 4D 0009:



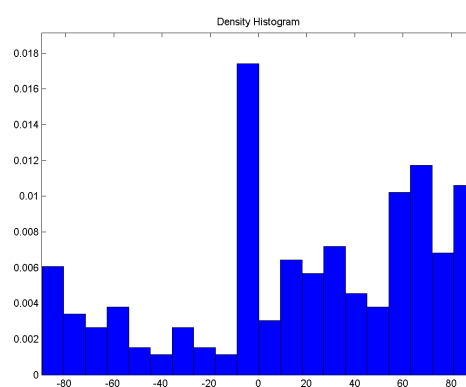
Obr.č.147: Vláknenná struktura



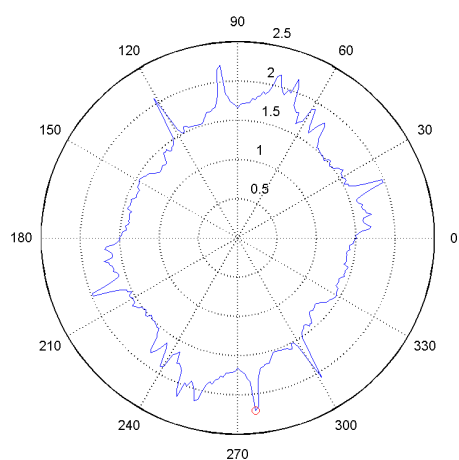
Obr.č.148: Směrové vektory



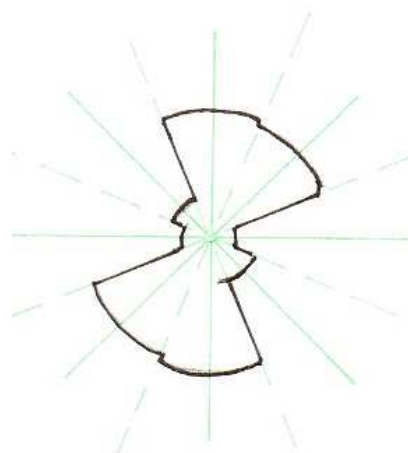
Obr.č.149: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.150: Graf. znázornění směrové orientace

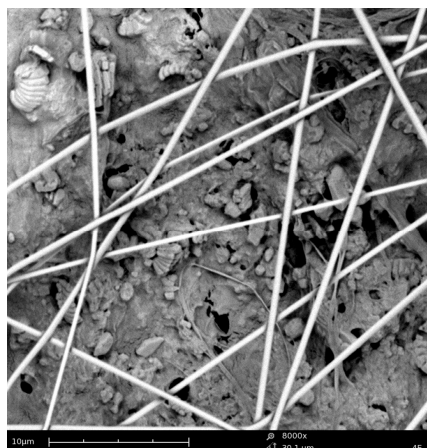


Obr.č.151: Polární diagram

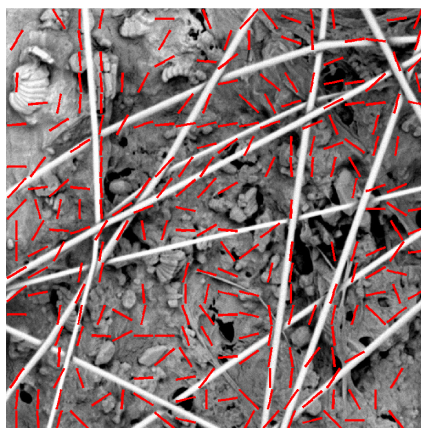


Obr.č.152: Směrová růžice

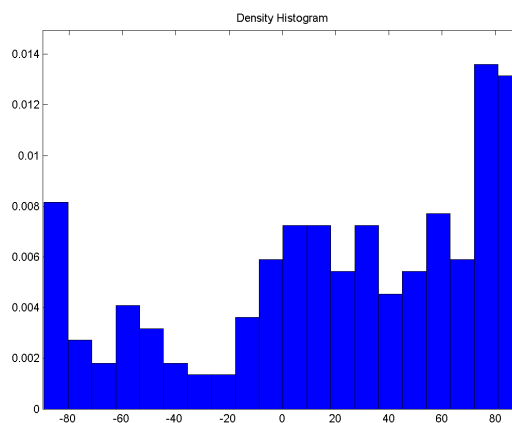
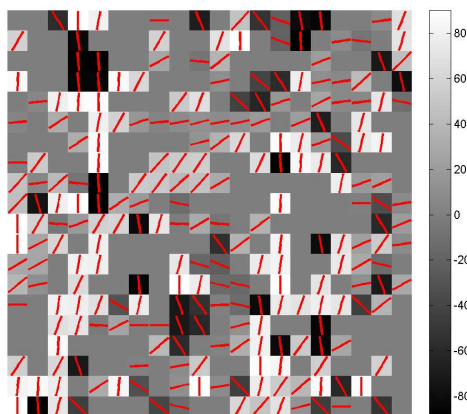
Směrová orientace vlákněných útvarů – snímek 4E 0010:



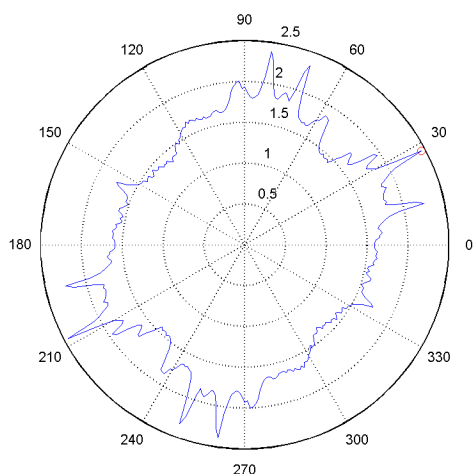
Obr.č.153: Vlákněná struktura



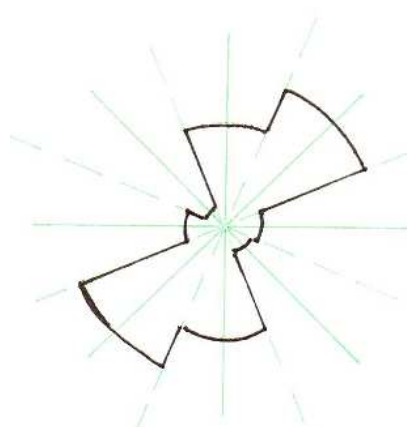
Obr.č.154: Směrové vektory



Obr.č.155: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.156: Graf. znázornění směrové orientace



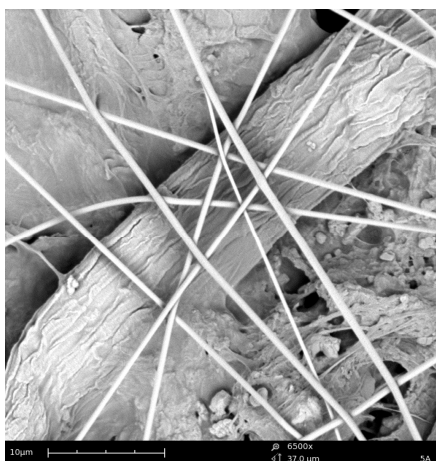
Obr.č.157: Polární diagram



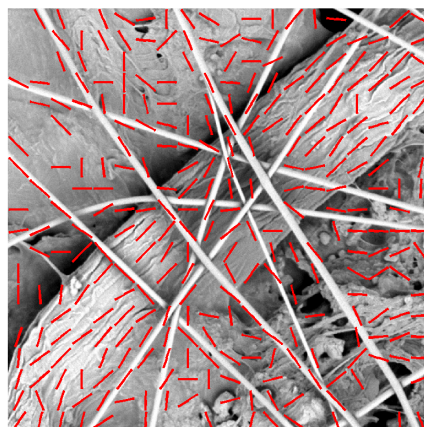
Obr.č.158: Směrová růžice



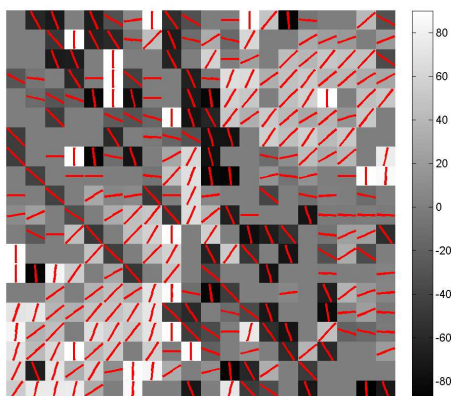
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 5A 0012:



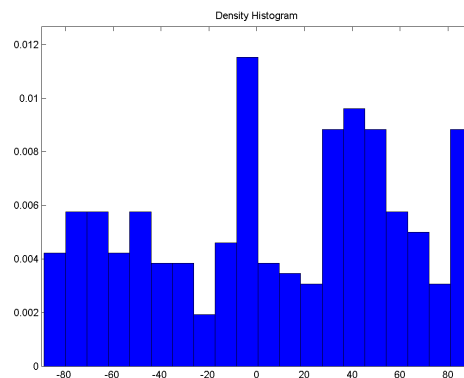
Obr.č.159: Vláknenná struktura



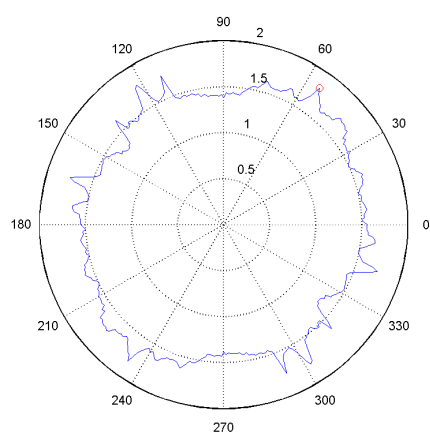
Obr.č.160: Směrové vektory



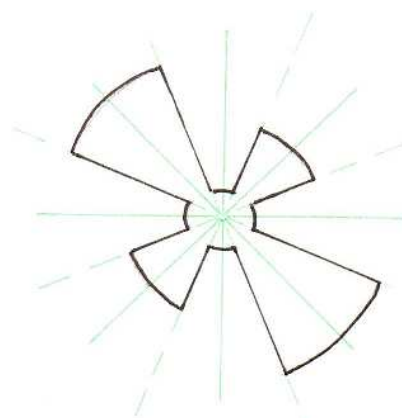
Obr.č.161: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.162 Graf. znázornění směrové orientace

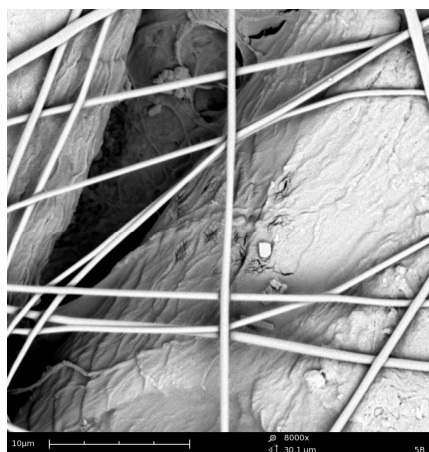


Obr.č.163: Polární diagram

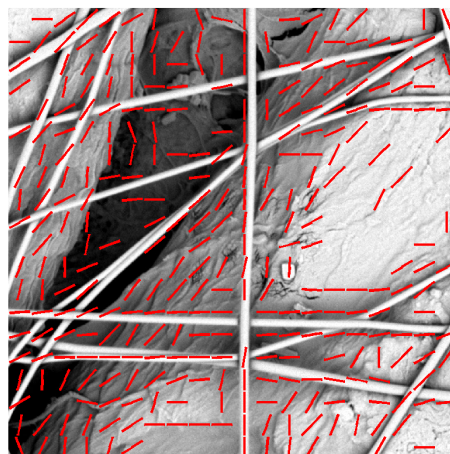


Obr.č.164: Směrová růžice

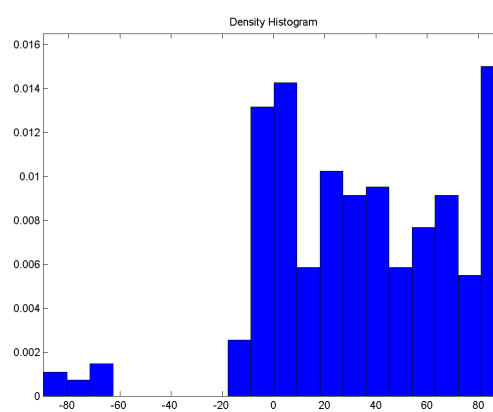
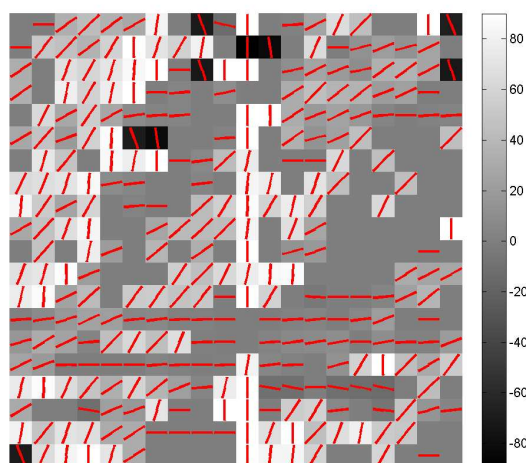
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 5B 0007:



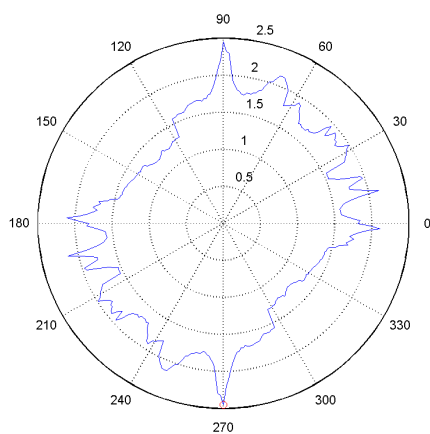
Obr.č.165: Vláknenná struktura



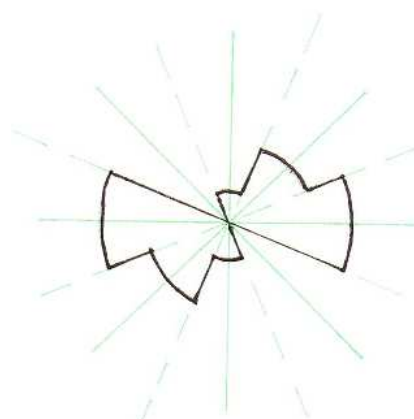
Obr.č.166: Směrové vektory



Obr.č.167: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.168: Graf. znázornění směrové orientace

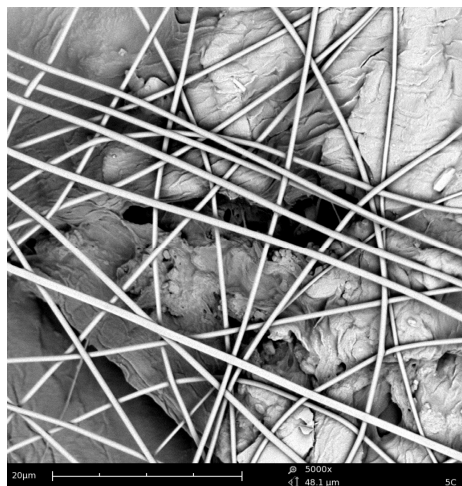


Obr.č.169: Polární diagram

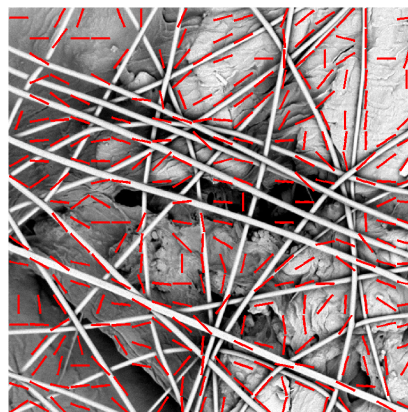


Obr.č.170: Směrová růžice

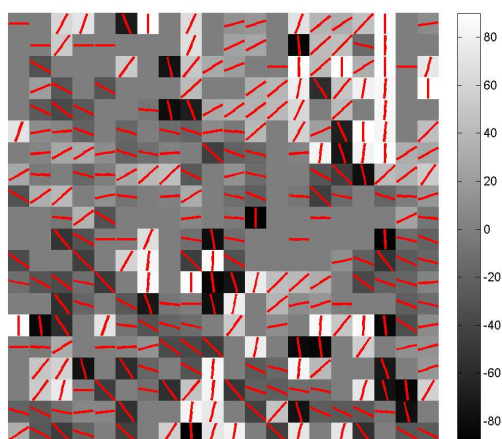
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 5C 0009:



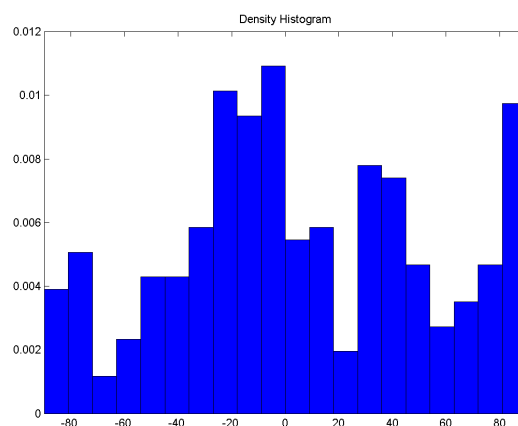
Obr.č.171: Vláknenná struktura



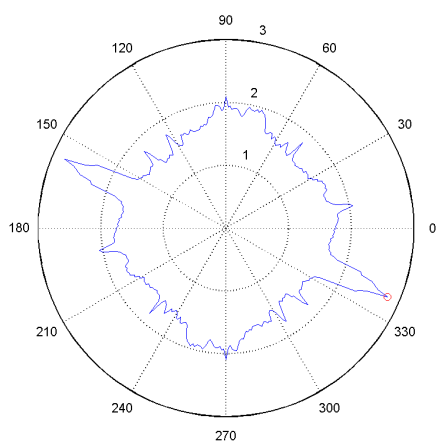
Obr.č.172: Směrové vektory



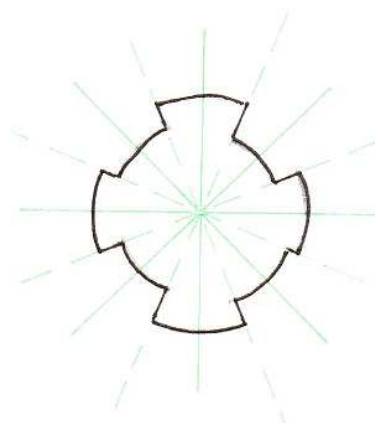
Obr.č.173: Směrové uspořádání pomocí elipsy



Obr.č.174: Graf. znázornění směrové orientace



Obr.č.175: Polární diagram



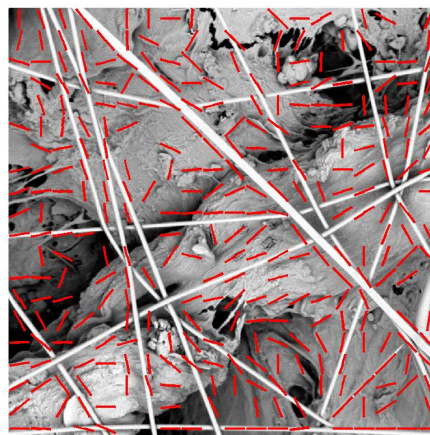
Obr.č.176: Směrová růžice



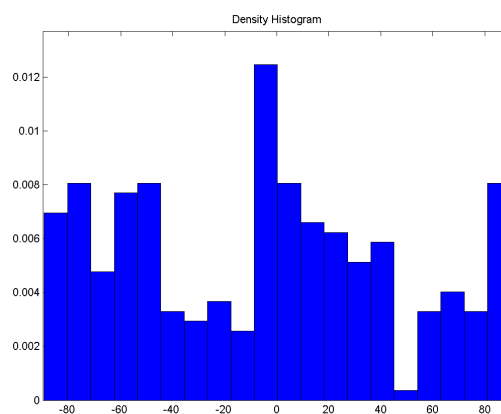
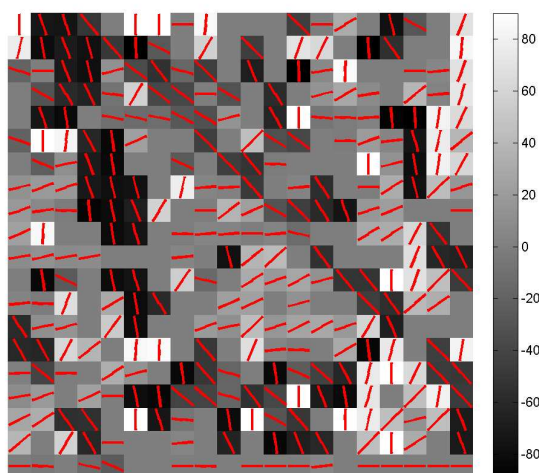
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 5D 0008:



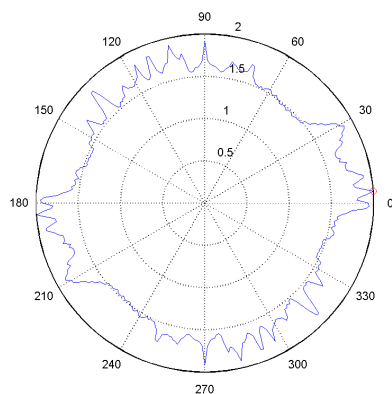
Obr.č.177: Vláknenná struktura



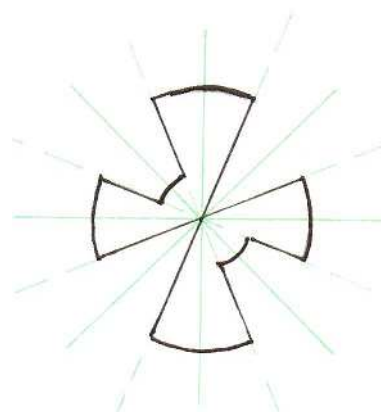
Obr.č.178: Směrové vektory



Obr.č.179: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.180: Graf. znázornění směrové orientace



Obr.č.181: Polární diagram

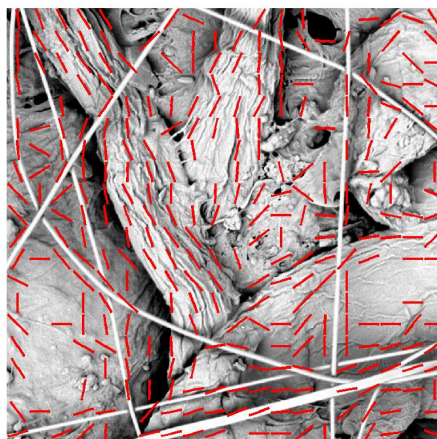


Obr.č.182: Směrová růžice

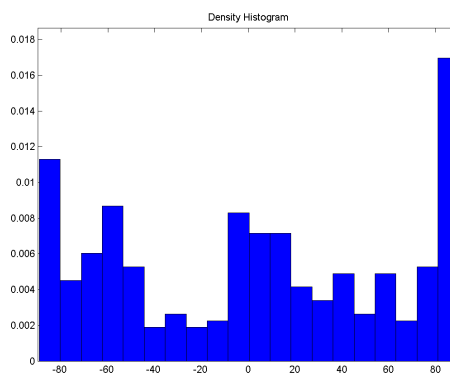
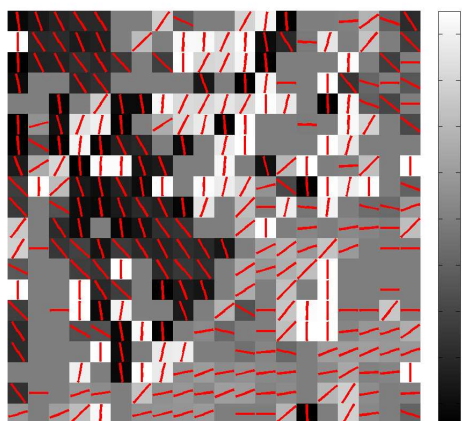
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 5E 0008:



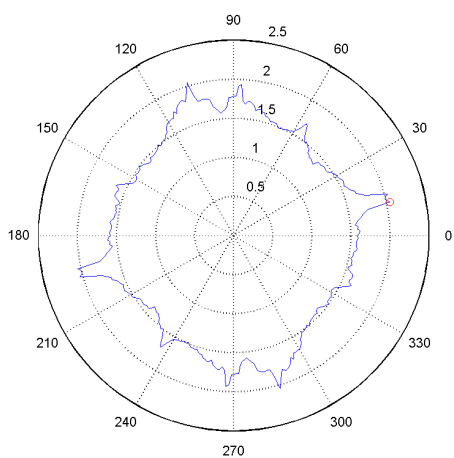
Obr.č.183: Vláknenná struktura



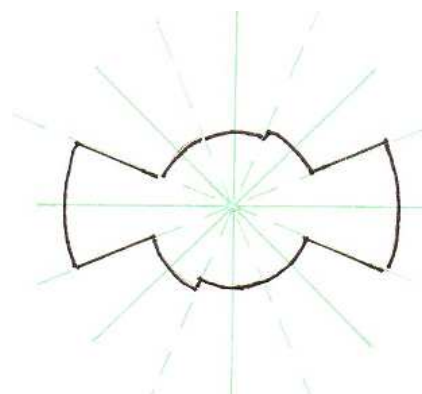
Obr.č.184: Směrové vektory



Obr.č.185: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.185: Graf. znázornění směrové orientace



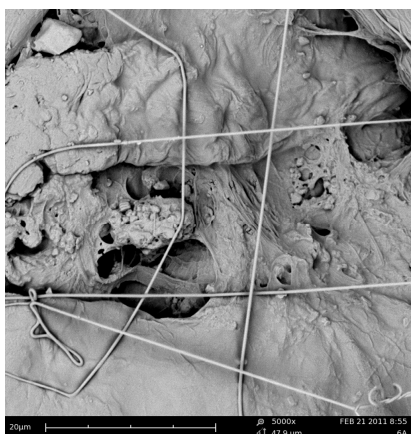
Obr.č.187: Polární diagram



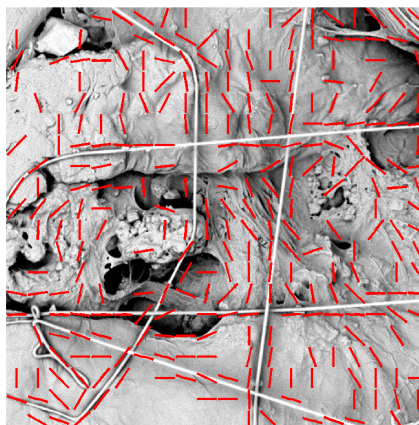
Obr.č.188: Směrová růžice



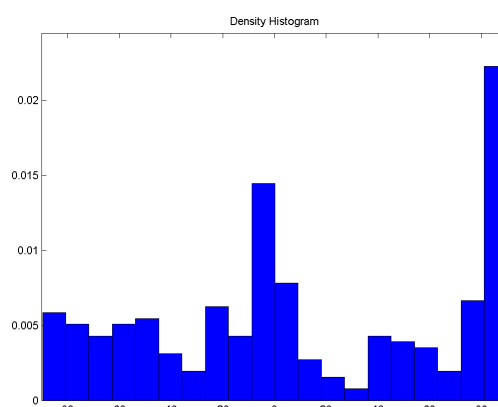
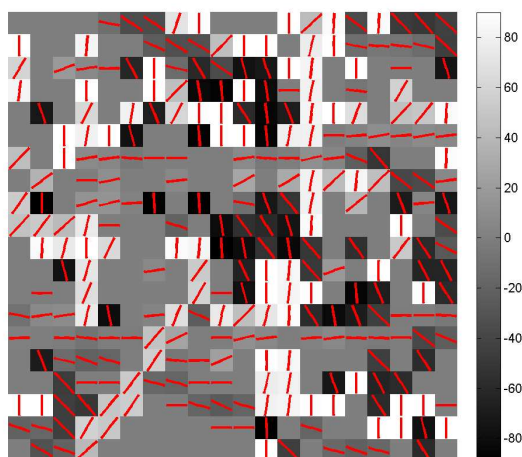
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 6A 0008:



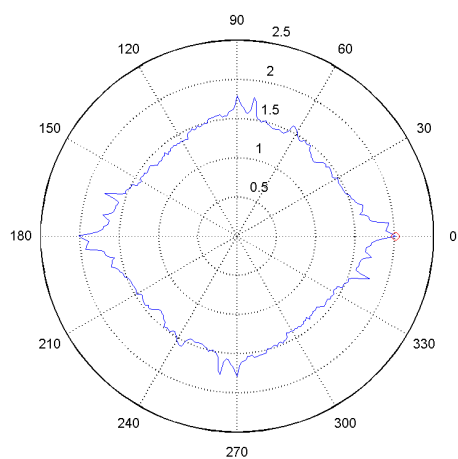
Obr.č.189: Vláknenná struktura



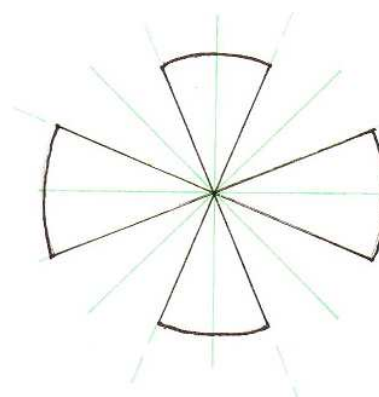
Obr.č.190: Směrové vektory



Obr.č.191: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.192: Graf. znázornění směrové orientace



Obr.č.193: Polární diagram

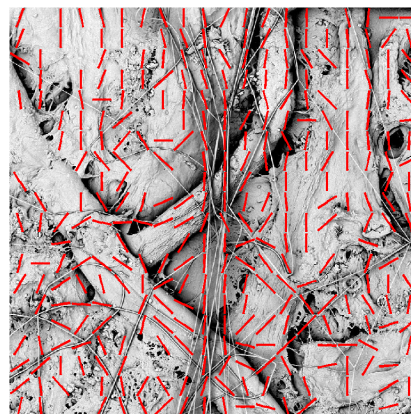


Obr.č.194: Směrová růžice

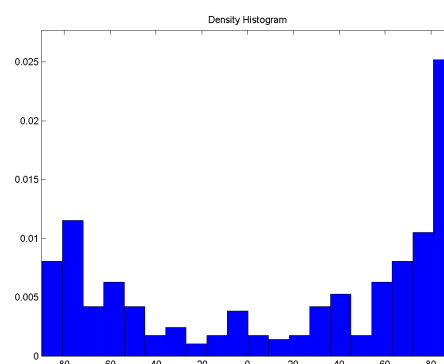
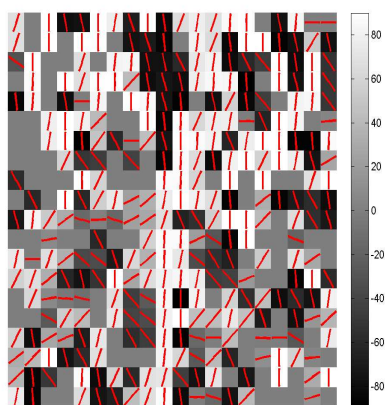
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 6B 0001:



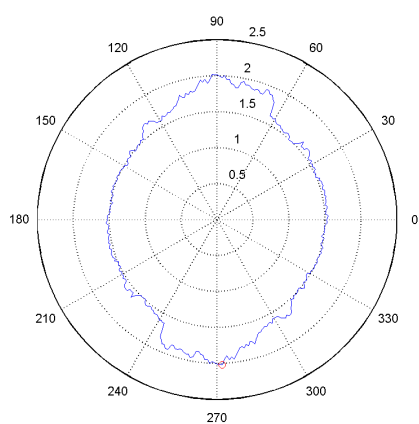
Obr.č.195: Vláknenná struktura



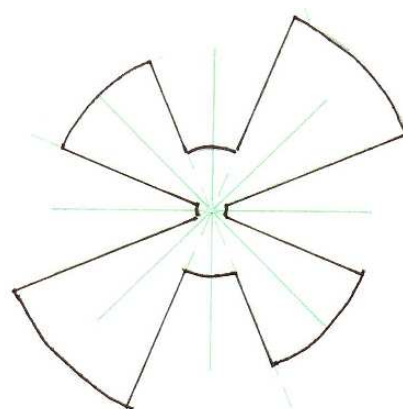
Obr.č.196: Směrové vektory



Obr.č.197: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.198: Graf. znázornění směrové orientace



Obr.č.199: Polární diagram

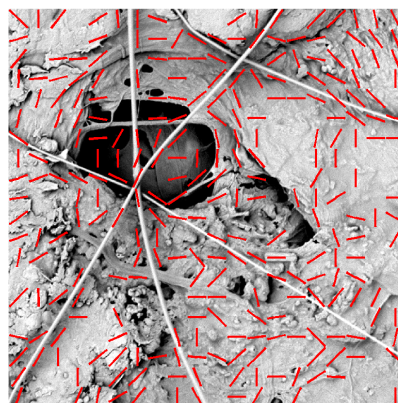


Obr.č.200: Směrová růžice

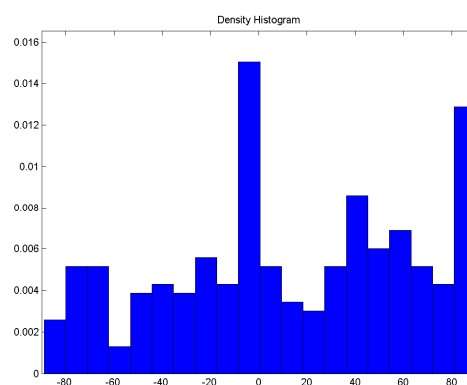
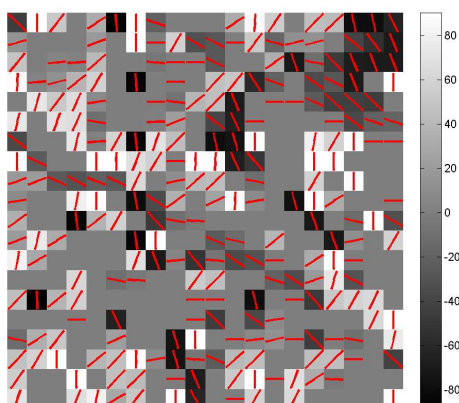
Směrová orientace vláknenných útvarů - snímek 6C 0008:



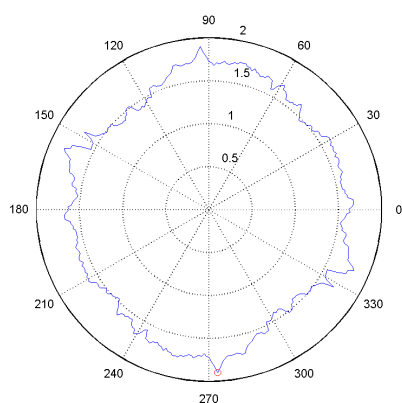
Obr.č.201: Vláknenná struktura



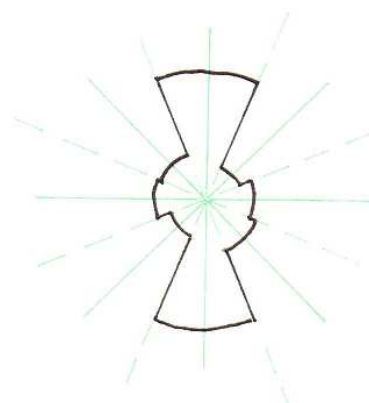
Obr.č.202: Směrové vektory



Obr.č.203: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.204: Graf. znázornění směrové orientace



Obr.č.205: Polární diagram



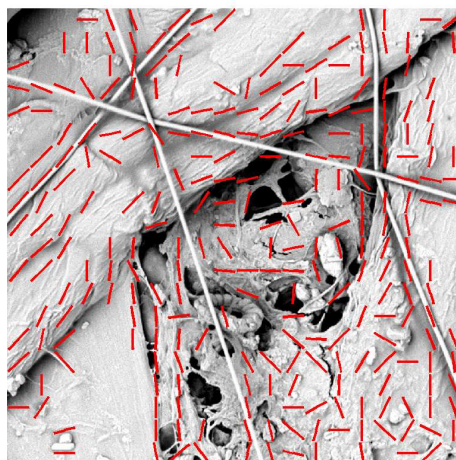
Obr.č.206: Směrová růžice



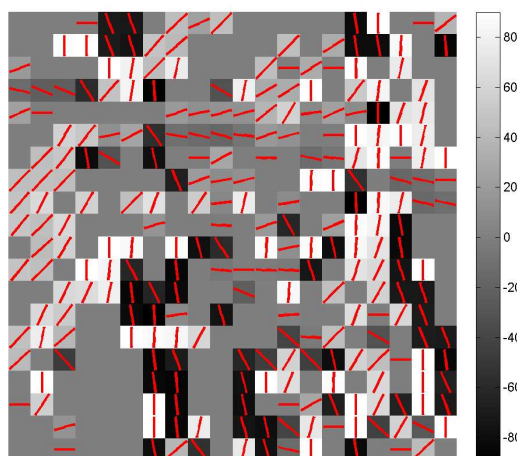
Směrová orientace vláknenných útvarů – snímek 6D 0006:



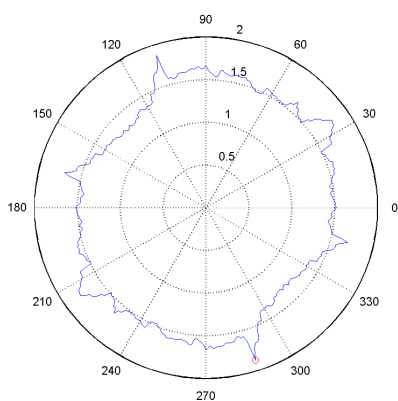
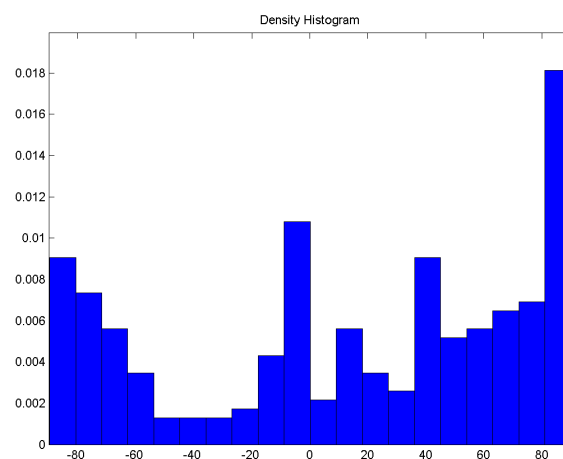
Obr.č.207: Vláknenná struktura



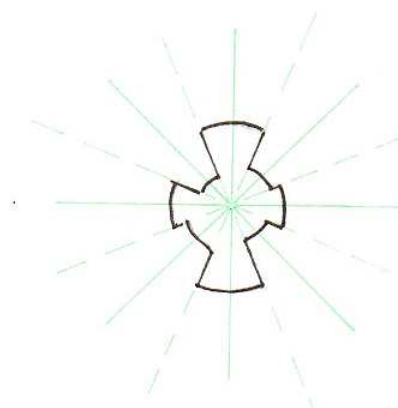
Obr.č.208: Směrové vektory



Obr.č.209: Směrové uspořádání pomocí elipsy Obr.č.210: Graf. znázornění směrové orientace



Obr.č.211: Polární diagram



Obr.č.212: Směrová růžice